



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* de frações  
alcaloídicas de diferentes espécies da família Amaryllidaceae e da  
licorina**

**Maressa Dietrich Rosa**

**VITÓRIA**

**2017**



Maressa Dietrich Rosa

**Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* de frações  
alcaloídicas de diferentes espécies da família Amaryllidaceae e da  
licorina**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Espírito Santo, como requisito  
parcial para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências Farmacêuticas, do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni

Coorientador: Dr. Warley de Souza Borges

Vitória

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)

---

R788a Rosa, Maressa Dietrich, 1985 -  
Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* de frações  
alcaloídicas de diferentes espécies de Amaryllidaceae e da licorina /  
Maressa Dietrich Rosa – 2017.  
77 f. : il.

Orientador: Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni.  
Coorientador: Warley de Souza Borges.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Acanthamoeba castellanii*. 2. Liliaceae. I. Bueloni, Cinthia Furst Leroy  
Gomes. II. Borges, Warley de Souza. III. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 615


---

Maressa Dietrich Rosa

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Acanthamoeba castellanii* DE  
FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DA  
FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE E DA LICORINA**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 04/04/2017 para obtenção  
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências  
Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

**BANCA EXAMINADORA:**



**Profª Dra Marilise Brittes Rott / UFRGS**



**Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa / UFES**



**Profª Dra Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni (orientadora) / UFES**

**Vitória**

**2017**

*“Porque melhor é a sabedoria do que os rubis, e de tudo o que se deseja nada se pode comparar com ela. Eu, a sabedoria, habito com a prudência, e acho a ciência dos conselhos.”*

(Provérbios 8: 11 e 12)

*“Então irei ao altar de Deus, do Deus que é a minha grande alegria, e com harpa te louvarei, ó Deus, Deus meu.”*

(Salmos 43:4)

*“Tua é, Senhor, a magnificência, e o poder, e a honra, e a vitória, e a majestade; porque teu é tudo quanto há nos céus e na terra; teu é, Senhor, o reino, e tu te exaltaste sobre todos como chefe. E as riquezas e glória vêm diante de ti, e tu dominas sobre tudo, e na tua mão há força e poder, e na tua mão está o engrandecer e dar força a tudo. Agora, pois, ó Deus nosso, graças te damos e louvamos o nome da tua glória.”*

(I Crônicas 29: 11 a 13)

Ao meu esposo e à minha família por todo amor, incentivo e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo amor incondicional, sustento e direção em todos os instantes da minha vida.

Aos meus pais, Marx e Ivana, pelo amor, dedicação, conselhos e ensinamentos em todas as etapas da minha vida.

Ao meu esposo, Marcos, pelo amor, companheirismo, força, incentivo e compreensão em todos os momentos da nossa vida.

Aos meus irmãos, Mateus e Marx, pelo amor, companheirismo, paciência, amizade e alegria em todos os dias.

Aos meus familiares, especialmente minhas avós Hanna Frieda e Maria Gessi, por todo amor, atenção, conselhos e orações.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Cinthia Fusrt Leroy Gomes Bueloni, por todos os ensinamentos na área de parasitologia, especialmente pela oportunidade de trabalhar com *Acanthamoeba* e aprimorar meus conhecimentos nesta área. Por toda confiança, incentivo, compreensão, paciência em me orientar nestes dois anos de pesquisa.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Warley de Souza Borges, pelos ensinamentos, confiança e oportunidade de trabalhar com a família Amaryllidaceae.

Ao Dr. Jean Paulo de Andrade pela disposição em me ensinar e esclarecer os aspectos químicos de Amaryllidaceae, além da colaboração com as análises de CG-EM dos extratos desta família botânica.

Ao Prof. Dr. Warley de Souza Borges, responsável pelo Laboratório de Produtos Naturais/UFES pela disponibilização dos extratos enriquecidos em alcaloides de Amaryllidaceae para a realização dos testes amebicidas.

Ao prof. Rodrigo Rezende Kitagawa, responsável pelo Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais/UFES pela disponibilidade de fazer as leituras em leitor de microplaca de Elisa.

Ao Prof. Dr. Gustavo Rocha Leite pelos esclarecimentos prestados nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Andrade de Souza e ao Dr. Raphael Conti pelas sugestões fornecidas para o aprimoramento deste trabalho durante a banca de qualificação.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilise Brittes Rott e ao Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa por terem aceitado o convite para a banca de defesa deste trabalho e pelas as sugestões

Aos meus colegas do Núcleo de Protozoologia/UFES, Cynara, Juliana, Guilherme, Raphael, Débora, Jéssica, Diógenes e Arthur pelos ensinamentos, companheirismo, dias de trabalho e aprendizado que passamos juntos.

A todos os professores e demais colegas do Laboratório de Parasitologia/UFES pela agradável convivência e ajuda para a realização desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela dedicação em ensinar e a pronta disponibilidade em ajudar.

Aos colegas do Mestrado 01/2015 pela amizade, compreensão, aprendizado e horas de estudo que passamos juntos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de aprendizado e formação profissional.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida.

A todos os demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários de ampla dispersão ambiental. *Acanthamoeba* é classificada como um dos gêneros de AVL e pode-se comportar como um parasita facultativo em seres humanos, causando duas doenças: Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), doença crônica do SNC, de difícil tratamento, e Ceratite Amebiana (CA), uma doença muito dolorosa da córnea ocular que pode levar a cegueira e a perda do globo ocular em casos mais críticos. O tratamento para CA é muito difícil, longo, tóxico e não apresenta total eficácia contra casos existentes. O grande desafio do tratamento é a alta toxicidade e a resistência aos medicamentos. O uso de plantas como fontes de pesquisa para novos compostos bioativos amebicidas têm demonstrado boa alternativa; já que estas apresentam alto poder amebicida e baixa toxicidade. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* *in vitro* de 22 frações enriquecidas em alcaloides de 12 espécies de Amaryllidaceae e do alcaloide licorina sobre trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* pelo uso do corante 3-(4,5-dimetil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Foi utilizado como controle positivo a clorexidina 0,02%. As espécies *Hippeastrum canastrense*, *Hippeastrum diniz-cruzae*, *Crinum giganteum*, *Hippeastrum puniceum* e a licorina apresentaram efeito dependente da concentração, sendo que *H. canastrense* e *H. diniz-cruzae* na concentração de 2000 µg.mL<sup>-1</sup> apresentaram alto poder amebicida (100% de inibição) superior a clorexidina (86% de inibição). A citotoxicidade destas frações e da licorina ainda foram avaliadas sobre células de mamíferos MDCK pelo uso do corante MTT e apresentaram efeito dependente da concentração, sendo que *H. diniz-cruzae* nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup> apresentou baixa citotoxicidade (5 a 7% de inibição) inferior a clorexidina (97% de inibição). O valor de IC<sub>50</sub> calculado para *H. canastrense*, *H. diniz-cruzae*, *Crinum giganteum*, *H. puniceum* e licorina foi de 285,61 a 962,75 µg.mL<sup>-1</sup> e o índice de seletividade (IS) foi de 1,27 a 7,0. A espécie *H. diniz-cruzae* apresentou resultados promissores, com alto poder amebicida (100% de inibição), baixa citotoxicidade (5 a 7% de inibição), menor valor IC<sub>50</sub> de 285,61 µg.mL<sup>-1</sup> e maior valor de IS (7,0), destacando-se como um alvo promissor para descoberta de novos fármacos com atividade anti-*Acanthamoeba castellanii*.

**Palavras-chave:** *Acanthamoeba castellanii*. Amaryllidaceae. Licorina. Atividade anti-*Acanthamoeba castellanii*. Citotoxicidade. MTT.



## ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) are protozoa of wide environmental dispersion. *Acanthamoeba* is classified as one of the genres of FLA and can behave as an elective parasite in humans, causing two diseases: Amebic Granulomatous Encephalitis (AGE), a chronic disease of the central nervous system, difficult to treat; and Amebic Keratitis (AK), a very painful ocular cornea disease that can lead to Blindness and loss of the eyeball in more critical cases. The treatment for CA is very difficult, long, toxic and does not present complete effectiveness against existing cases. The great challenge of the treatment is the high toxicity and the resistance to the medicines. The use of plants as research sources for new amebicidal bioactive compounds has shown a good alternative; since these have high amoebicidal power and low toxicity. The objective of this study was to investigate the in vitro anti-*Acanthamoeba castellanii* activity of 22 alkaloid enriched fractions of 12 species of Amaryllidaceae and the alkaloid lycorine on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites using 3- (4,5-dimethyl) 5-diphenyltetrazolium (MTT). Chlorhexidine 0.02% was used as a positive control. The species *Hippeastrum canastrense*, *Hippeastrum diniz-cruzae*, *Crinum giganteum* *Hippeastrum puniceum* and lycorine showed a concentration-dependent effect, with *H. canastrense* and *H. diniz-cruzae* at the concentration of 2000 µg.mL<sup>-1</sup>, with a high amebicide (100% Inhibition) greater than chlorhexidine (86% inhibition). The cytotoxicity of these fractions and the lycorine were also evaluated on MDCK mammalian cells by the use of the MTT dye and showed a concentration-dependent effect, and *H. diniz-cruzae* at concentrations of 250, 500 and 1000 µg.mL<sup>-1</sup> showed low cytotoxicity (5 to 7% inhibition) less than chlorhexidine (97% inhibition). The IC<sub>50</sub> value calculated for *H. canastrense*, *H. diniz-cruzae*, *Crinum giganteum*, *H. puniceum* and lycorine was from 285.61 to 962.75 µg.mL<sup>-1</sup> and the selectivity index (SI) was 1, 27 to 7.0. The *H. diniz-cruzae* species presented promising results, with high amebicidal power (100% inhibition), low cytotoxicity (5 to 7% inhibition), lower IC<sub>50</sub> value of 285.61 µg.mL<sup>-1</sup> and higher SI value (7,0), being a promising target for the discovery of new drugs with anti-*Acanthamoeba castellanii* activity.

**Keywords:** *Acanthamoeba castellanii*. Amaryllidaceae. Lycorine. Anti-*Acanthamoeba castellanii* activity. Cytotoxicity. MTT.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> com acantopódios, vacúolos e núcleo em contraste de fase .....	17
Figura 2 - Filogenia do gênero de <i>Acanthamoeba</i> .....	19
Figura 3 - Cistos de <i>Acanthamoeba</i> classificados morfológicamente segundo Pussard e Pons como sendo do grupo I (A), grupo II (B) e grupo III (C) .....	20
Figura 4 – Vascularização da córnea em paciente com Ceratite Amebiana .....	23
Figura 5 - Exemplos das reações de acoplamentos fenol oxidativos na família de Amaryllidaceae .....	29
Figura 6 - Estrutura química dos alcaloides típicos da família Amaryllidaceae .....	33
Figura 7 - Espécies do gênero <i>Hippeastrum</i> estudadas neste trabalho .....	34
Figura 8 - Inibição das 22 frações alcaloídicas de Amaryllidaceae sobre trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	49
Figura 9 - Inibição dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após exposição às 10 frações de Amaryllidaceae .....	50
Figura 10 – Viabilidade dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após a exposição as frações F4, F5, F17 e F19 .....	51
Figura 11 – Viabilidade dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após exposição à licorina e a clorexidina .....	52
Figura 12 – Viabilidade celular das culturas de MDCK após 48h de exposição às frações F4, F5, F17 e F19 .....	53
Figura 13 – Viabilidade celular das células MDCK após 48h de exposição à licorina .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise por CG-EM das frações das espécies de Amaryllidaceae.....	52
Tabela 2 - Valores de IC <sub>50</sub> , CC <sub>50</sub> e IS das frações alcalóidicas de Amaryllidaceae e da licorina .....	55
Tabela 3 - Inibição das 22 frações alcalóidicas de Amaryllidaceae e da clorexidina sobre os trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	72

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Espécies de Amaryllidaceae estudadas com local da coleta, parte coletada, sigla utilizada no trabalho e número de registro em herbário .....	37
Quadro 2 - Alcaloides identificados por CG-EM nas frações alcaloídicas .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de Etila

AVL – Amebas de Vida Livre

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

CA – Ceratite Amebiana

CC<sub>50</sub> – Concentração citotóxica de 50% das células

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

DMEN – *Dulbeco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EAG – Encefalite Amebiana Granulomatosa

Et<sub>2</sub>O – Éter dietílico

FDA - *Food and Drug Administration*

HeLa – Linhagem celular Henrietta Lacks

Hep G<sub>2</sub> – Linhagem celular de câncer do fígado humano

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50% da população

MDCK – *Madin-Darby canine Kidney*

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MTT - 3-(4,5-dimetil)-2,5-difeniltetrazólio

P.A. – Pró –Análise

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PHMB – Polihexametileno de biguanidina

PYG – *Peptone proteose, Yeast extract, Glucose*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Amebas de vida livre.....	15
2.2	Gênero <i>Acanthamoeba</i> .....	15
2.3	Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i> .....	21
2.3.1	Encefalite Amebiana Granulomatosa .....	21
2.3.2	Ceratite Amebiana.....	22
2.4	Família Amaryllidaceae.....	27
2.5	Gênero <i>Hippeastrum</i> .....	30
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	GERAL.....	35
3.2	ESPECÍFICOS .....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
4.1	Reagentes .....	36
4.2	Material vegetal .....	36
4.3	Coleta e identificação do material vegetal .....	37
4.4	Obtenção das frações alcaloídicas.....	38
4.5	Obtenção do alcaloide licorina .....	39
4.6	Preparação da solução de frações alcaloídicas para testes .....	39
4.7	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) .....	39
4.8	Isolado de <i>Acanthamoeba</i> .....	40
4.9	Cultura de trofozoítos .....	40
4.10	Ensaio da atividade anti- <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	41
4.11	Desenho experimental da atividade anti- <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	42
4.12	Origem das células .....	43

4.13	Cultura das células .....	43
4.14	Ensaio de citotoxicidade .....	44
4.15	Método de análise dos resultados.....	45
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
6	RESULTADOS .....	48
6.1	Primeira etapa de seleção das frações alcalóidicas .....	48
6.2	Segunda etapa de seleção das frações alcalóidicas .....	49
6.3	Frações alcalóidicas selecionadas.....	50
6.4	Análise por CG-EM.....	51
6.5	Licorina .....	52
6.6	Atividade citotóxica das frações alcalóidicas sobre células MDCK.....	53
6.7	Atividade citotóxica da licorina sobre as células MDCK .....	54
6.8	Determinação do IC <sub>50</sub> , CC <sub>50</sub> e Índice de Seletividade (IS) .....	54
7	DISCUSSÃO .....	56
8	CONCLUSÃO .....	63
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
10	APÊNDICES .....	72
11	ANEXOS .....	74
	Anexo I .....	74
	Anexo II .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

*Acanthamoeba* é classificada como um dos gêneros de amebas de vida livre (AVL) e pode comportar-se como um parasita facultativo em seres humanos, causando duas doenças: a Encefalite Granulomatosa Amebiana (EGA), uma doença rara que acomete o Sistema Nervoso Central de indivíduos imunocomprometidos que, geralmente, apresenta rápida progressão para a morte; e a Ceratite Amebiana (CA), uma doença dolorosa que acomete a córnea ocular de indivíduos imunocompetentes, e que em nível avançado pode causar a cegueira (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006).

O número de casos notificados de CA vem aumentando em todo o mundo a cada ano, devido ao aumento do uso de lentes de contato para correção da visão e fins cosmética associada à falta de higiene dos usuários. Em 2006, o pesquisador Khan fez um alerta sobre este aumento no número de casos envolvendo as amebas de vida livre quando relata o aumento discrepante do número de artigos publicados no PubMed, entre os anos de 1960 a 2004; onde destaca-se o gênero *Acanthamoeba*, que entre os anos de 1960 e 1970 havia um número de aproximadamente 10 artigos publicados enquanto no ano de 2004 haviam 120 artigos, confirmando mais uma vez a grande importância deste gênero no universo da pesquisa científica (KHAN, 2006).

É de grande importância esse aumento no número de pesquisas sobre *Acanthamoeba* e a Ceratite Amebiana porque é necessário um avanço no conhecimento científico sobre esta doença, e consequentemente, para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais específicas e eficazes. O tratamento para CA enfrenta vários desafios como sérios problemas de toxicidade dos fármacos sobre o tecido da córnea, a resistência, principalmente dos cistos, aos fármacos utilizados, dificuldade de adesão ao tratamento devido ao pequeno intervalo posológico no uso dos fármacos, difícil acesso a aquisição dos medicamentos já que alguns são produzidos em outros países, e em virtude disto, é adotada uma grande variedade de fármacos para o tratamento como antibióticos, antissépticos, antifúngicos, antiprotozoários e antivirais. Até o momento, nenhum agente quimioterapêutico tem sido adotado como um tratamento exclusivo eficaz



contra a doença (ALVARENGA; FREITAS; HOFLING-LIMA, 2000; HAMMERSMITH, 2006; KUZMA et al., 2015; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Portanto, existe uma grande urgência em pesquisar e desenvolver novos fármacos que sejam eficazes e seguros para tratamento da Ceratite Amebiana a fim de minimizar os obstáculos do tratamento atualmente utilizado. A triagem de plantas medicinais têm se destacado como uma alternativa promissora para descoberta de novas substâncias bioativas que possam ser úteis para o desenvolvimento de novas terapias para CA (OBEID et al., 2003; GOZE et al., 2009).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Amebas de vida livre

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários de ampla dispersão ambiental, que podem ser encontrados em vários ambientes, como no solo, ar, água e poeira. A presença destas amebas nestes ambientes geralmente está associada com a presença de outros micro-organismos, como fungos, bactérias e algas, porque são utilizados como fonte de alimento. As AVL não necessitam de um hospedeiro em seu ciclo de vida e, eventualmente, aquelas que são bem adaptadas ao parasitismo podem causar infecções severas em diferentes espécies de animais e nos seres humanos. (PAGE, 1970; ALVARENGA; FREITAS; HOFLING-LIMA, 2000; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004).

A estas amebas, que são capazes de viver como organismos de vida livre e, ocasionalmente, habitar em um hospedeiro causando danos, foi dada a denominação de anfizóicas. Como representantes deste grupo de amebas se enquadram algumas espécies do gênero *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e a *Sappinia pedata* (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; VISVESVARA et al., 2007).

### 2.2 Gênero *Acanthamoeba*

Quando o gênero *Acanthamoeba* foi descoberto por Castellani, em 1930, em culturas do fungo *Cryptococcus pararoseus*, ele as descreveu como amebas

redondas ou ovais com diâmetro de 13,5 - 22,5  $\mu\text{m}$ . O prefixo *Acanth* (em grego, picos) foi adicionado ao termo “amoeba” para indicar a presença de estruturas como espinha em sua superfície que atualmente são conhecidos como acantopódios. Após essa descoberta, estes organismos foram ignorados por quase três décadas, quando em 1958, Culbertson realizando testes de segurança da vacina de Poliomielite descobriu o potencial patogênico destes organismos pela primeira vez, demonstrando sua capacidade de produzir efeitos citopáticos *in vitro* em células renais de macaco, e a de matar animais de laboratório *in vivo* (CASTELLANI, 1930; CULBERSTON et al. 1958; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006).

O primeiro caso claramente identificado em seres humanos foi no ano de 1972 quando um paciente com a doença de Hodgkin foi diagnosticado com a Encefalite Granulomatosa Amebiana (EGA) e os primeiros casos de Ceratite Amebiana (CA) foram relatados em 1974 por Nagington e colaboradores. No Brasil, os primeiros casos a serem descritos por Nosé e colaboradores foram no ano de 1988, quando estes pesquisadores descreveram casos de úlcera na córnea causados por *Acanthamoeba* em quatro pacientes, sendo estes usuários de lente de contato (NAGINGTON et al., 1974; NOSE et al., 1988; KHAN, 2006).

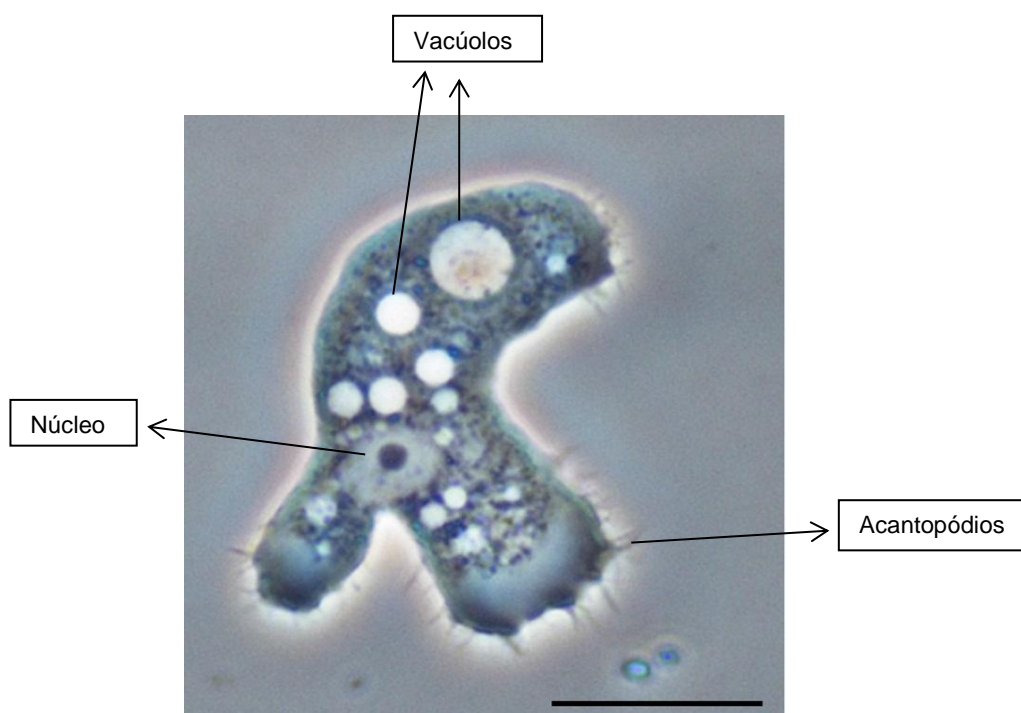
Com o passar dos anos, ficou comprovada a importância destas amebas como agentes etiológicos destas doenças devido ao grande aumento do número de casos descritos em pesquisas (KHAN, 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

*Acanthamoeba* apresenta um ciclo de vida simples, já que este protozoário apresenta apenas duas formas evolutivas: a trofozoítica com um formato irregular (ameboide), metabolicamente ativa; e a cística, como uma forma de resistência, metabolicamente dormente (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006;).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* apresentam tipicamente a forma ameboide, medindo de 15 - 45  $\mu\text{m}$  de comprimento e 780  $\mu\text{m}^3$  de volume; medidas estas que incluíram *Acanthamoeba* no grupo das pequenas amebas de vida livre. É característica marcante nos trofozoítos a presença de diversos acantopódios como é observado na Figura 1 que são finas expansões citoplasmáticas no formato de espinhos que são importantes na adesão às superfícies, movimentos celulares ou na captura de presas. Normalmente possuem um único núcleo que é cerca de um sexto

do seu tamanho, circular, com nucléolo central pronunciado e estruturas denominadas de amebostomas ou *food cups*, responsáveis pela ingestão de bactérias, fungos, algas, leveduras por fagocitose e de matéria orgânica líquida por pinocitose (ROGERSON; PATTERSON, 2000; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Figura 1 - Trofozoíto de *Acanthamoeba* com acantopódios, vacúolos e núcleo em contraste de fase



Barra de escala: 10  $\mu$ m

Fonte: Adaptado de Lorenzo-Morales; Khan; Walochnik (2015).

Imagem reproduzida segundo texto contido no artigo: "Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição da *Creative Commons*, que permite o uso irrestrito, distribuição e reprodução, em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado."

Possuem ainda vários vacúolos citoplasmáticos, que em sua maioria são digestivos, com a presença bem definida de um vacúolo contrátil, que tem a função de expulsar a água excedente do interior da ameba (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KHAN, 2006).

Possui todas as organelas observadas nas células de mamíferos, como o complexo de Golgi, retículo endoplasmático, ribossomos livres e diversas mitocôndrias alongadas ou arredondadas. Grânulos de glicogênio e de lipídios são também observados em seu citoplasma, além da presença de proteínas acessórias responsáveis pela geração de tração para o movimento ameboide e fagocitose (OSTRAP et al., 2003).

Para manter-se na fase trofozoítica, *Acanthamoeba* necessita de uma fonte de alimento abundante, pH neutro e temperatura adequada, 30 °C. No entanto, em condições adversas, ou seja, na falta de alimentos, em condições de hiper ou hiposmolaridade, em extremos de temperaturas e pH, ocorre a mudança da fase trofozoítica para a cística. Nesta mudança de fase, o trofozoíto torna-se metabolicamente inativo, exibindo uma atividade metabólica mínima, encerrando-se dentro de uma concha resistente. Mais precisamente, o trofozoíto condensa-se em uma estrutura arredondada, conhecida como pré-cisto, que amadurece num cisto de dupla membrana, composta pelo endocisto e ectocisto (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KHAN, 2006;).

Os cistos de *Acanthamoeba* medem aproximadamente 12 - 25 µm de diâmetro, sendo uninucleados, com parede de dupla membrana com forma arredondada e enrugada, onde a forma do endocisto que pode ser arredondada, triangular, estrelada ou poligonal, determina sua característica taxonômica. Possuem uma região de menor deposição fibrosa que está conectada ao corpo celular chamada de ostíolo, sendo esta a região por onde as amebas emergem dos cistos quando ocorre o processo de desencistamento (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

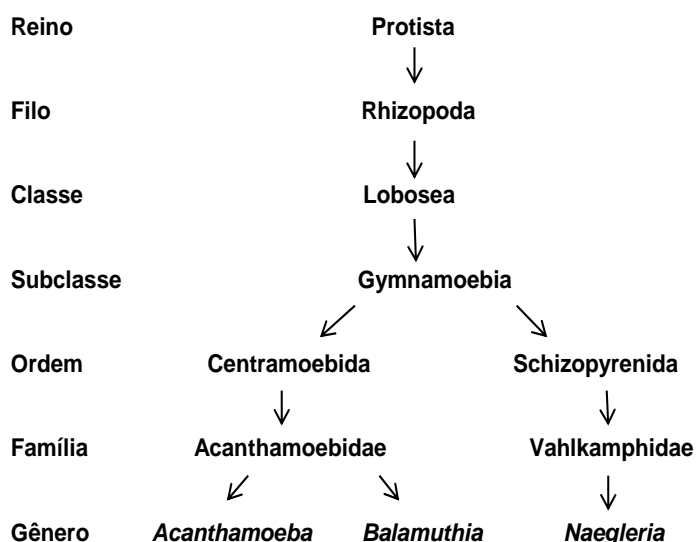
No processo de encistamento, é formado primeiramente o ectocisto, parede externa do cisto, em seguida é formado o endocisto; porém o corpo celular das amebas fica aderido à região onde ocorreu a menor deposição de fibras, resultando na formação do ostíolo e ainda ocorre uma deposição de celulose em suas paredes císticas. É através do ostíolo que o cisto monitora as mudanças ambientais e quando estas se tornam favoráveis, ocorre o desencistamento, eliminando o ectocisto e retornando para a fase trofozoíta, completando assim seu ciclo (CHAVEZ-MUNGUÍA et al., 2005; KHAN, 2006).

Pesquisas mostram que os cistos são extremamente resistentes a diversas condições de estresse, como radiação, temperaturas extremas, agentes biocidas, antibióticos, hipoclorito de sódio, entre outros. Esta forte resistência dos cistos a estas condições tão hostis é possível pela presença da parede dupla celulósica, composta pelo endocisto e ectocisto, que também resistem à ação de diversas soluções desinfetantes como as soluções de limpeza de lentes de contato e alguns agentes tóxicos a trofozoítas (KILVINGTON; ANGER, 2001; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; DUDLEY et al., 2007).

A proliferação no número de amebas ocorre por divisão celular, de forma assexuada, por divisão binária. Para as amebas que apresentam um crescimento exponencial, como é o caso do gênero *Acanthamoeba*, o ciclo celular resulta em 90% na fase G<sub>2</sub>, 2-3 % de fase M, 2-3 % de fase S e uma pequena porção insignificante para fase G<sub>1</sub> (BYERS et al.,1991; KHAN, 2006).

Taxonomicamente, o gênero *Acanthamoeba* é classificado como pertencente ao Reino Protista, Filo Rhizopoda, Classe Lobosea, Sub-classe Gymnamoebia, Ordem Centramoebida, Família Acanthamoebidae, Gênero *Acanthamoeba* (Figura 2) (ROGERSON; PATTERSON, 2000; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Figura 2 - Filogenia do gênero de *Acanthamoeba*

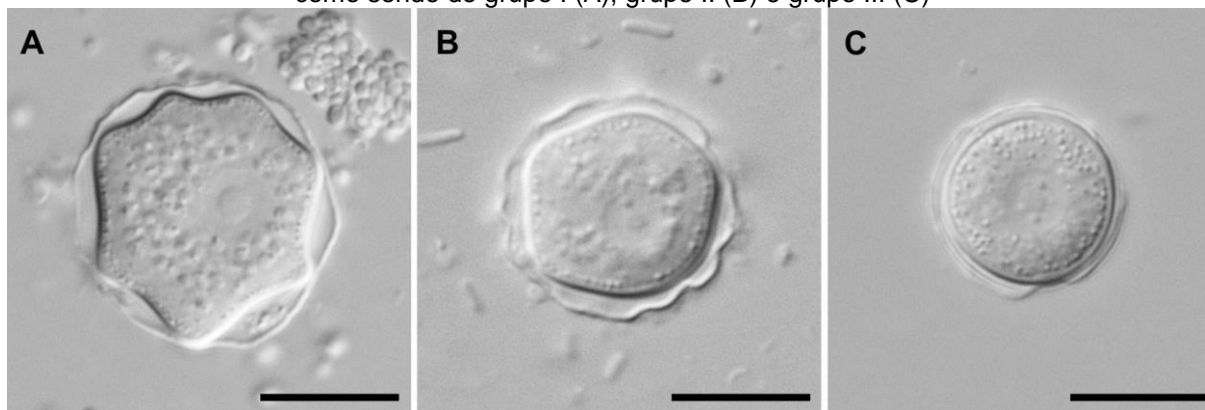


Fonte: Adaptado de Marciano-Cabral e Cabral (2003).

Devido à dificuldade de estabelecer um único critério taxonômico para classificar o gênero *Acanthamoeba* e com o intuito de organizar as espécies isoladas, Pussard e Pons no ano de 1977 propuseram a divisão do gênero de acordo com as características morfológicas dos cistos, criando assim três grupos morfológicos. As espécies pertencentes ao grupo I (Figura 3 A) apresentam cistos relativamente grandes quando são comparados aos dos outros grupos, com um diâmetro maior ou igual a 18 µm, podendo ser facilmente reconhecidos pelo aspecto estrelado do endocisto. As do grupo II, (Figura 3 B), apresentam um cisto que possui um diâmetro médio menor que 18 µm, ectocisto ondulado e irregular e o endocisto com formas levemente estreladas, poliédricas, globulares, ou ovóides. É neste grupo que se encontram a maioria das amebas isoladas, entre elas a *Acanthamoeba*.

*castellani*. E por último, o grupo III (Figura 3 C), onde se enquadra o cisto que apresenta o diâmetro médio menor ou igual a 18 µm, ectocisto liso ou levemente ondulado e um endocisto oval ou angular (PUSSARD; PONS, 1977; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Figura 3 - Cistos de *Acanthamoeba* classificados morfológicamente segundo Pussard e Pons como sendo do grupo I (A), grupo II (B) e grupo III (C)



Barra de escala: 10 µm

Fonte: Adaptado de Lorenzo-Morales; Khan; Walochnik (2015).

Imagem reproduzida segundo texto contido no artigo: "Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição da *Creative Commons*, que permite o uso irrestrito, distribuição e reprodução, em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado."

Por muitos anos, a morfologia dos cistos foi o único critério para a identificação e classificação do gênero *Acanthamoeba*, porém com o desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos, baseados nas sequências de RNA e DNA ribossomal específicos para o gênero *Acanthamoeba* comprovou-se que existia diferença molecular entre os isolados de uma mesma espécie de *Acanthamoeba* e por causa desta descoberta, a classificação do gênero sofreu uma revolução no ano de 1998, quando Stothard e colaboradores, a partir da análise das sequências do gene da subunidade 18S do DNA ribossomal de diversos isolados de amebas reclassificou o gênero *Acanthamoeba* em grupos de sequências gênicas enumerados de T1 a T15. Observou-se, assim, que os grupos gênicos não tinham relação com a classificação por espécie, evidenciando que a identificação molecular era a mais precisa. Em 2001, Schroeder e colaboradores demonstraram que a utilização de somente algumas regiões altamente variáveis desse gene era o suficiente para diferenciar os genótipos de *Acanthamoeba* (STOTHARD et al., 1998; SCHROEDER et al., 2001).

Após esta descoberta, vários autores vêm utilizando essas variações na sequência do gene 18S rDNA para a realização da classificação molecular de *Acanthamoeba* e a classificação atualmente mais utilizada é a estabelecida por

Schroeder e colaboradores (2001). As sequências gênicas das cepas de referência de *Acanthamoeba* disponíveis até o momento totalizam 19 genótipos, sendo que a grande maioria dos casos de ceratite amebiana identificados mundialmente é causada pelo genótipo T<sub>4</sub> de *Acanthamoeba*, mas os genótipos T<sub>3</sub> e T<sub>11</sub> também são comumente associados a esta doença (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

## 2.3 Infecções causadas por *Acanthamoeba*

As infecções causadas por *Acanthamoeba* geralmente acontecem quando os trofozoítos ou cistos deste protozoário, presentes no meio ambiente, entram em contato com os olhos, feridas na pele ou pelo trato respiratório do hospedeiro, resultando no possível estabelecimento e proliferação da ameba no organismo, sendo que este processo é dependente em algumas situações do *status* imunológico do hospedeiro. Dentre as infecções causadas, as mais importantes são a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e a Ceratite Amebiana (CA) (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

### 2.3.1 Encefalite Amebiana Granulomatosa

A EAG é uma doença rara caracterizada por uma infecção crônica e lentamente progressiva do Sistema Nervoso Central (SNC) que também pode atingir os pulmões. Geralmente acomete indivíduos imunocomprometidos portadores de outras doenças, como lúpus eritematoso sistêmico, diabetes, insuficiência renal, cirrose, tuberculose, úlceras da pele, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e doença de Hodgkin (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004).

A via de infecção pode ocorrer pela inalação de amebas por meio dos orifícios nasais e pulmões ou pela introdução do parasita através de lesões na pele. O acesso ao SNC pode ocorrer pela disseminação hematogênica nos pulmões, pele ou diretamente pelo neuroepitélio olfativo. Os sintomas desta infecção incluem dor de cabeça, confusão, náuseas, vômitos, febre, letargia, torcicolo, déficits

neuroológicos focais, ou sinais de aumento da pressão intracraniana. (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KHAN, 2006).

O tratamento para EAG é muito complicado, especialmente pela falta de sintomas específicos e de métodos diagnósticos que sejam eficientes. Geralmente os pacientes que apresentam o comprometimento do SNC são tratados com antibióticos e antifúngicos, como por exemplo, a rifampicina, trimetoprima, cetoconazol, entre outros. Porém, o prognóstico de sucesso é pequeno devido à demora do diagnóstico, o estado imunodeficiente do paciente e a falta de fármacos específicos para eliminar o patógeno. O curso clínico da doença pode ser fulminante, com rápida progressão para morte, sendo que a maioria dos pacientes morre em menos de um mês após o início dos sintomas neurológicos (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007).

### **2.3.2 Ceratite Amebiana**

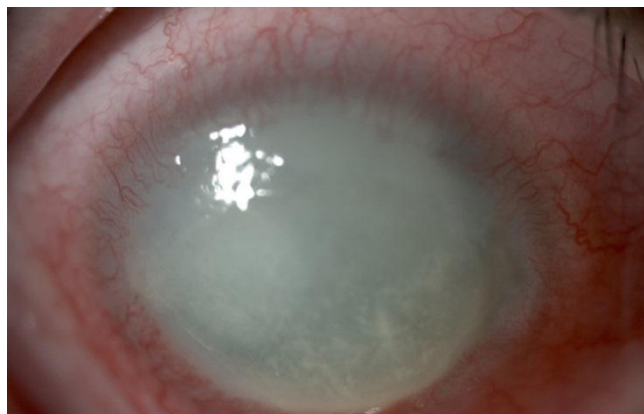
A CA é uma infecção aguda da córnea, que apresenta uma rápida progressão e é extremamente dolorosa, podendo resultar na diminuição da acuidade visual e em cegueira. Ao contrário dos pacientes com EAG, a CA acomete os indivíduos saudáveis, imunocompetentes (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

O início dos sintomas pode levar de alguns dias a várias semanas, dependendo do tamanho do inoculo de *Acanthamoeba* e da extensão do trauma da córnea. No desenvolvimento da infecção, os sintomas mais comuns são a produção considerável de lágrimas, fotofobia, inflamação com vermelhidão, infiltração de estroma, edema estromal e opacidade (Figura 4), além da dor aflitiva ocasionada pela neurite radial, relatada como uma dor suicida (KHAN, 2006).

O principal fator de risco para CA é o uso das lentes de contato associado à falta de higiene no uso destas, e para comprovar esta afirmação observa-se que em mais de 85% dos casos da doença ocorrem em usuários de lentes de contato e isto está diretamente ligado ao comportamento individual do usuário. Além disso, *Acanthamoeba* apresenta significativamente maior preferência de ligação a lentes de contato hidrogel de silicone do que a lentes de contato de hidrogel convencionais (NIEDERKORN et al., 1999; BEATTIE et al., 2003).



Figura 4 – Vascularização da córnea em paciente com Ceratite Amebiana



Fonte: Adaptado de Lorenzo-Morales; Khan; Walochnik (2015).

Imagem reproduzida segundo texto contido no artigo: "Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição da *Creative Commons*, que permite o uso irrestrito, distribuição e reprodução, em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado."

A córnea intacta é altamente resistente à infecção por *Acanthamoeba*, porém a presença de algum trauma de córnea seguido da exposição à água seja durante a prática de esportes aquáticos ou a lavagem do olho, a poeira, a matéria vegetal ou a qualquer partícula estranha que esteja contaminada pode aumentar, em muito, o risco de desenvolver a CA já que o protozoário *Acanthamoeba* pode estar presente em todos estes locais (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

A CA é uma doença incluída no banco de dados Orphanet (ORPHA67043) com uma prevalência estimada de 1-9 / 100.000. Pesquisadores como Parmar e colaboradores (2006) acreditam que a incidência desta doença possa ser dez vezes mais elevada do que realmente é registrado. O fato de o diagnóstico errôneo ser comum na maioria dos casos de CA afirma a hipótese de que o número de casos registrados da doença seja realmente menor do que o número total de casos (PARMAR et al., 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Um aumento dramático na incidência da CA foi visto na década de 80, atribuído em grande parte ao aumento do uso de lentes de contato gelatinosas, do uso de soluções de lentes de contato não estéreis e comprimidos salinos caseiros. Surto adicionais no final da década de 90 e início do ano de 2000 foram também relatados nos Estados Unidos e na Europa, quando foram associados a contaminação de fontes de águas de abastecimento, inundações regionais e a higiene inadequada das lentes de contato (PAGE; MATHERS, 2013).

No Brasil, Carvalho e colaboradores (2009) realizaram um estudo durante vinte anos, entre os meses de janeiro de 1987 a dezembro de 2006, em 581

pacientes que tinham suspeita clínica de CA. A partir do ano de 1996 houve um aumento considerável do número de pacientes suspeitos e com a doença diagnosticada, podendo ser associado ao aumento do uso das lentes de contato pela população. Ainda foi relatado que dos 185 pacientes diagnosticados com CA, 153 (83%) foram relatados como usuários de lentes de contato, enquanto que os outros 32 foram relacionados com lesões oculares causadas por corpos estranhos (CARVALHO et al., 2009).

Há uma grande dificuldade em definir o diagnóstico da doença, pois na fase inicial, a CA pode ser facilmente confundida com a ceratite causada pelo vírus *Herpes simplex*, enquanto na fase avançada, a infecção se assemelha ao quadro clínico de uma ceratite fúngica ou de uma úlcera da córnea (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

O padrão ouro para realizar o diagnóstico da CA é a cultura; e este é um método confiável e correto para identificar o protozoário causador da doença, pois é realizado por meio da raspagem da córnea do paciente. Desta forma identifica-se diretamente o agente causador da doença. Várias técnicas baseadas em reações de cadeia polimerase (PCR) são utilizadas também para a realização do diagnóstico desta doença e isto aumenta em muito a sensibilidade dos resultados (RIVIÈRE et al., 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Até o momento não há procedimentos ou um único medicamento que possa eliminar as duas formas do parasita, cística e trofozoíta, porém a forma trofozoíta do protozoário apresenta a vantagem de ser mais facilmente eliminada. Os regimes de tratamento disponíveis relatados na literatura são amplamente diversificados, dependendo de como se manifesta a doença, do estado geral de saúde da córnea infectada, e da experiência do profissional clínico (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

O tratamento atual disponível para CA consiste de agentes antimicrobianos tópicos, que podem atingir concentrações elevadas no local da infecção. A maior parte destes medicamentos utilizados é eficaz contra os trofozoítos e cistos, tais como as biguanidas, sendo o polixametileno de biguanidina (PHMB) eficaz a baixas concentrações (0,02%), porém apresenta toxicidade para as células da córnea humana e a clorexidina, parcialmente eficaz contra as duas formas amebianas, e em concentrações mínimas não apresenta toxicidade para as células epiteliais da córnea. Contudo, a existência de uma forma cística altamente resistente à terapia

faz com que seja necessária a utilização de uma combinação de fármacos (LORENZO-MORALES et al., 2013; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

A clorexidina na concentração de 0,02% é muitas vezes utilizada em combinação com as diamidinas aromáticas tais como isotionato de propamidina 0,1% na forma de colírio, comercialmente conhecido como Brolene® (Sanofi, Reino Unido), dibromopropamidina 0,15%, hexamidina 0,1% também na forma de colírio conhecido comercialmente como Desomedine® (Chauvin, França) e neomicina. Estas combinações entre as biguanidas e diamidinas aromáticas mostram bons resultados quando o tratamento é aplicado no início da doença, porém o uso do Brolene pode ser tóxico e estimular a resistência (LORENZO-MORALES et al., 2013; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Os fármacos são administrados a cada hora imediatamente após a retirada do tecido desvitalizado da córnea ou durante os primeiros três dias de tratamento, dependendo da resposta clínica do paciente. Após este período, a frequência é reduzida para cada três horas. Para alcançar uma resposta clínica perceptível são necessários quinze dias de tratamento e a duração total do tratamento é de no mínimo de três a quatro semanas; sendo que alguns autores ainda recomendam um tratamento mais prolongado com duração de seis a doze meses. Mesmo com a finalização do tratamento, recomenda-se a observação do paciente com frequência para evitar o retorno da infecção (ALVARENGA; FREITAS; HOFLING-LIMA; 2000; OBEID et al., 2003; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Existe grande dificuldade na obtenção destes medicamentos, já que estes muitas vezes não são liberados para uso por órgãos reguladores em alguns países, além do fato de serem fármacos importados. Ainda, em alguns casos, para controlar a intensa dor, os pacientes fazem uso de analgésicos narcóticos (HAMMERSMITH, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2013; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

A raspagem da córnea com fármacos antifúngicos também faz parte do tratamento, porém a utilização de medicamentos antifúngicos, antibacterianos, antivirais e corticosteroides podem dificultar o tratamento, pois estes causam uma melhora inicial aparente e em seguida ocorre um agravamento da doença. Além das dificuldades de adesão ao tratamento, resistência e toxicidade dos fármacos, o diagnóstico errôneo comum na maioria dos casos e uma falta de consenso para o

diagnóstico, todas estas situações fazem com que esta terrível doença ainda permaneça significativa nos nossos dias (LORENZO-MORALES et al., 2013; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

A ação dos fármacos não fica restrita apenas ao parasita, quando o seu efeito também atinge a membrana plasmática das células da córnea, causando ulceração no epitélio, o desaparecimento dos queratócitos e o mau funcionamento do endotélio da córnea. Como efeito colateral é observado a ceratopatia tóxica que pode ser desencadeada a qualquer momento, exigindo uma mudança significativa no plano de tratamento. A pressão intraocular elevada associada com o aumento da inflamação, muitas vezes leva ao uso de medicamentos anti-glaucoma e cicloplégicos. O papel dos corticosteroides tópicos e da intervenção cirúrgica com ceratoplastia penetrante permanece ainda controverso no tratamento da ceratite amebiana (LIM et al., 2008; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Uma importante barreira a ser rompida para se obter um tratamento eficaz e seguro da CA é a resistência do cisto. Ao contrário das infecções com outras amebas, *Acanthamoeba* pode formar cistos no interior do tecido e, se um único cisto sobreviver na córnea, ele pode conduzir a reinfecção. Por causa disto, a comprovação da eficácia definitiva da terapia deve ser verificada continuamente. A progressão da infecção deve ser acompanhada de uma a duas semanas rigorosamente. Após a recuperação clínica, é aconselhável acompanhamento mensal, de preferência até por seis meses após o fim dos sintomas (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

A resistência ao tratamento é devida, principalmente, pela presença do ectocisto e endocisto, que formam uma barreira protetora de parede dupla contra a terapia utilizada. Os cistos também podem ser resistentes aos medicamentos porque eles estão em fase de dormência, com pouca ou nenhuma atividade metabólica e por causa da pressão seletiva do uso contínuo dos fármacos (TURNER et al., 2000).

Desta forma, a busca por novos fármacos que sejam mais efetivos e específicos contra as formas trofozoíta e cística de *Acanthamoeba* é uma necessidade urgente para o avanço no tratamento da ceratite amebiana. Em pesquisas, exemplares botânicos de diversas espécies, têm apresentado elevada atividade amebicida e baixa citotoxicidade, sendo capazes de inibir as formas trofozoítas e císticas de *Acanthamoeba*, alguns até mais eficientes que a terapia

utilizada. À procura de novas alternativas para a descoberta de compostos bioativos eficazes contra *Acanthamoeba* que novas espécies botânicas têm sido avaliadas quanto ao seu potencial amebicida (BADRIA et al., 2014)

## 2.4 Família Amaryllidaceae

Exemplares da família Amaryllidaceae têm sido utilizados por milhares de anos com finalidade terapêutica. Os alcaloides presentes em seus extratos têm sido objeto de investigação química por mais de um século, sendo que nas últimas décadas, estes alcaloides têm sido isolados, caracterizados e sintetizados quimicamente para estudo de suas atividades para os mais diversos alvos biológicos. Dentre estas atividades, observam-se as atividades antitumoral, antiviral, inibidor da enzima acetilcolinesterase, imunoestimulante, antimalárica e antiprotozoária (SENER, ORHAN, SATAYAVIVAD, 2003; BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006; OSORIO et al., 2010; PAGLIOSA et al., 2010; LUO et al., 2012).

A família Amaryllidaceae, é composta de um grupo de Monocotiledôneas (ordem Asparagales) representado por mais de 1600 espécies distribuídas em aproximadamente 73 gêneros. Seus representantes estão distribuídos ao longo dos trópicos e em algumas regiões temperadas. No vasto território nacional, as espécies de Amaryllidaceae encontram-se distribuídas em aproximadamente 18 gêneros e 135 espécies (JIN, 2011; CANDIDO et al. 2013; DUTILH; OLIVEIRA, 2015).

Devido à beleza e cor de suas flores, estas espécies são utilizadas em vários países com finalidade ornamental; e ainda são conhecidas popularmente como lírio, açucena, estrela do norte e bastão do imperador (HOFMANN JUNIOR et al., 2004).

A mais recente revisão taxonômica desta família considera que as espécies anteriormente classificadas dentro da família Amaryllidaceae pertencem, atualmente, a uma nova subfamília denominada Amaryllidoideae. Neste sentido, a atual grande família das Amaryllidaceae engloba também as espécies das novas subfamílias Agapanthoideae e Allioideae, que antes eram consideradas famílias Agapanthaceae e Alliaceae, respectivamente. Convém ressaltar que as espécies apresentadas no presente trabalho pertencem a subfamília Amaryllidoideae, e os alcaloides aqui tratados são aqueles exclusivos desta subfamília. No entanto, a referência a estes

alcaloides como sendo “alcaloides de Amaryllidaceae” ainda está presente no meio fitoquímico (BREMER et al., 2009; CHASE et al., 2009).

Desde a antiguidade é evidenciado o uso destas plantas como medicamentos para várias doenças, como por exemplo, o uso do óleo de *Narcissus poeticus* L. pelo médico grego Hipócrates para o tratamento do câncer em seus pacientes, ainda no século IV a.C. e a espécie *Lycoris radiata* que foi utilizada na medicina popular chinesa para o tratamento de poliomielite (PETTIT et al., 1986; FENG et al., 2011).

No continente africano, onde é considerado berço de diversificação primária da família, existem inúmeros relatos da utilização de espécies de Amaryllidaceae para as mais diversas finalidades, onde se destacam os gêneros *Crinum*, *Clivia*, *Cyrtanthus*, *Amaryllis* e principalmente, o gênero *Boophane*. No continente americano, berço de diversificação secundária da família, pode-se encontrar relatos medicinais para os gêneros *Hymenocallis*, *Pyolirion*, *Stenomesson*, *Ismene* e, no Brasil, os gêneros *Hippeastrum* e *Eucharis* (ALBUQUERQUE et al., 2007; SILVA et al., 2012; NAIR; VAN STADEN, 2013; RIBEIRO; JUNIOR, 2016).

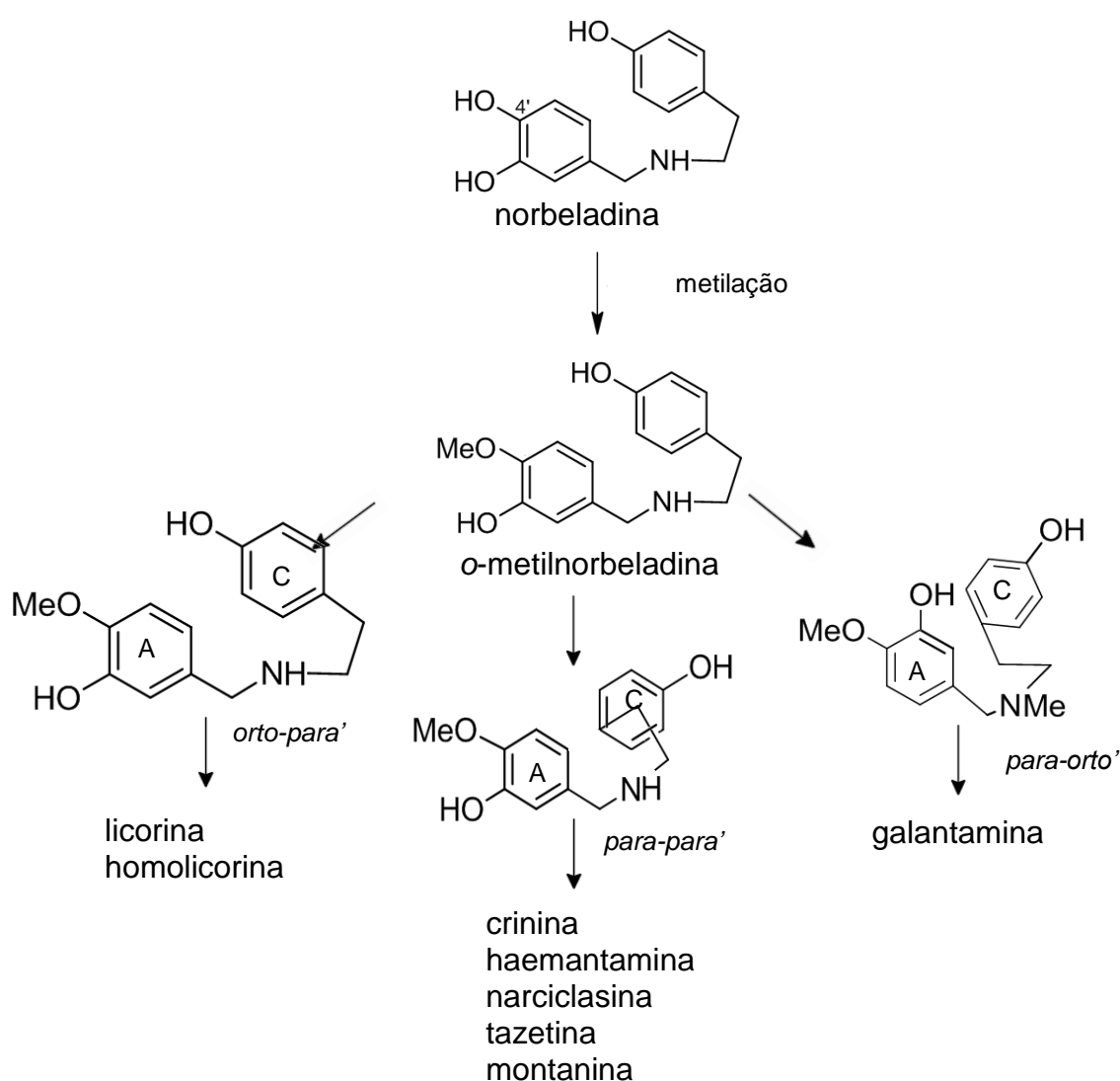
Uma característica peculiar a esta família é a presença consistente de um exclusivo grupo de alcaloides, derivados de isoquinolinas, no qual são comumente encontrados em praticamente todas as espécies de Amaryllidaceae estudadas até o presente. Considera-se a família Amaryllidaceae como uma das 20 famílias mais importantes em presença de alcaloides, dos quais se podem atribuir relevante importância e associação com as atividades biológicas desenvolvidas por cada exemplar desta família (BASTIDA; LAVILLA; VILADOMAT, 2006; UNVER, 2007; BESSA, 2015).

Este grupo de alcaloides de Amaryllidaceae deriva-se dos aminoácidos *L*-tirosina e *L*-fenilalanina, dando origem a um precursor comum denominado norbeladina. Esta por sua vez, ao ser metilada especificamente origina a *O*-metilnorbeladina, que sofre diversos tipos de reações de acoplamentos fenol oxidativos, resultando nos variados esqueletos básicos, característicos desta família. Estas estruturas são classificadas em nove tipos de esqueletos (Figura 5), sendo eles a norbeladina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina, montanina e galantamina (BASTIDA, LAVILLA; VILADOMAT, 2006; BASTIDA et al., 2011).

Dentre os alcaloides acima mencionados, destacamos a importância do alcaloide galantamina, isolado ainda em 1950 a partir de extratos de *Galanthus*

*nivalis*, como um inibidor seletivo e reversível da enzima acetilcolinesterase, o que provoca um aumento dos níveis de acetilcolina no cérebro, por isto a galantamina é utilizada clinicamente para o tratamento paliativo da doença de Alzheimer (REYES-CHILPA et al., 2011).

Figura 5 - Exemplos das reações de acoplamentos fenol oxidativos na família de Amaryllidaceae



Fonte: Adaptado de Bastida et al. (2011).

## 2.5 Gênero *Hippeastrum*

O gênero *Hippeastrum*, representante da família Amaryllidaceae, é originário e endêmico da América do Sul, sendo também encontrado na América Central até o México. No Brasil, encontra-se amplamente distribuído ao longo do nosso território, onde é representado por 30 espécies, das quais 21 são endêmicas. Estas se desenvolvem em vários ambientes, como em pântanos, prados, árvores, rochas, perto da praia ou em altas montanhas (DUTILH, 2005; ANDRADE et al., 2011; DUTILH; OLIVEIRA, 2015).

A palavra *Hippeastrum* é de origem grega, onde *Astron* significa estrela e está associado ao aspecto estrelado de suas flores. As espécies deste gênero são popularmente conhecidas como lírios, açucenas, cebola-do-mato, cebola-berrante; e entre os floricultores como “Amaryllis”. Diversas espécies têm sido cultivadas como ornamentais, como o *Hippeastrum elegans*, *H. puniceum*, *H. striatum*, dentre outras (DAHLGREN et al., 1985; AMARAL, 2006).

Existem poucos estudos envolvendo os aspectos químicos e farmacológicos de espécies de *Hippeastrum*, quando comparamos com os demais gêneros de ocorrência européia e asiática. Pesquisas realizadas na região Sul do Brasil, revelaram a presença de alguns compostos bioativos importantes nas espécies de *Hippeastrum*, como a candimina, isolada de *Hippeastrum morelianum*, que apresentou citotoxicidade frente ao parasita *Trichomonas vaginalis*, e a montanina, purificada de *Hippeastrum vittatum*, que apresentou atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, semelhante à galantamina (GIORDANI et al., 2008; GIORDANI; VIEIRA et al., 2010; PAGLIOSA et al., 2010).

Outro importante alcaloide, também já purificado do gênero *Hippeastrum*, é a licorina, sendo um dos mais típicos da família. A licorina apresenta capacidade de inibir células de melanoma murino, carcinoma pulmonar, ascite murino, células de leucemia humanas e células HeLa. Os derivados deste alcaloide também são ativos frente a linhagens celulares resistentes a apoptose, sendo que a licorina atua na retroalimentação positiva das caspases 3, 7 e 9, o que resulta num efeito global pró-apoptótico (GHOSAL et al., 1985; LIKHITWITAYAWUID et al., 1993; LIN et al., 1995; LAMORAL-THEYS et al., 2010; VAN GOITSENOVEN et al., 2012).



Os derivados do esqueleto básico do tipo homolicorina, como mencionado, também já foram purificados de espécies de *Hippeastrum*, destacando-se o alcaloide candimina com promissora habilidade de inibição de ectonucleotidases do parasita *Trichomonas vaginalis*. Estes derivados do esqueleto ainda apresentam atividades citotóxicas, antirretroviral e hipotensora (BASTIDA, LAVILLA; VILADOMAT, 2006; GIORDANI, WEIZENMANN et al., 2010).

Os esqueletos básicos do tipo crinina e haemantamina são também comumente encontrados em espécies de *Hippeastrum*. Biologicamente, eles são caracterizados pelas atividades antiproliferativas frente às linhagens celulares de leucemia, linfoma, melanoma e hepatoma humano Hep G2 (ALARCÓN; CEA; WEIGERT, 1986; LIKHITWITAYAWUID et al., 1993; YOUSSEF; FRAM, 1998; BASTIDA et al., 2011; ANDRADE et al., 2012).

Estudos recentes apontam que o esqueleto básico haemantamina apresenta maior potência como indutor de apoptose em células tumorais do que seu enantiômero crinina. Os esqueletos básicos do tipo crinina e haemantamina já demonstraram atividades antiparasitárias, onde foram destacados os alcaloides haemantamina e crinamina frente a cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina, e crinamina frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma cruzi* (LIKHITWITAYAWUID et al., 1993; TRAM et al., 2002; BASTIDA, LAVILLA; VILADOMAT, 2006; MCNULTY et al., 2007; EVIDENTE et al., 2009; BERKOV et al., 2011)

O esqueleto básico do tipo tazetina é comumente encontrado em espécies de *Hippeastrum* e o alcaloide tazetina apresenta atividade frente a linhagem Col2 de câncer de cólon de camundongos. A tazetina ainda apresenta efeitos hipotensores e antimaláricos (ANTOUN et al., 1993; BASTIDA, LAVILLA; VILADOMAT, 2006).

O esqueleto básico do tipo montanina, isolado em quantidades apreciáveis de *H. vittatum*, apresentou atividade antitumoral frente a linhagens de adenocarcinoma de cólon, carcinoma de pulmão, carcinoma de célula renal, câncer de mama e câncer ovariano epitelial. Este alcaloide também se destacou por apresentar potentes atividades do tipo antidepressiva, ansiolítica e anticonvulsiva, após injeção intraperitoneal em ratos. A montanina apresentou capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase, além de ser capaz de ativar enzimas relacionadas com os processos de formação de memória (SILVA, 2005; SILVA et al., 2006; SILVA et al., 2008; PAGLIOSA et al., 2010).

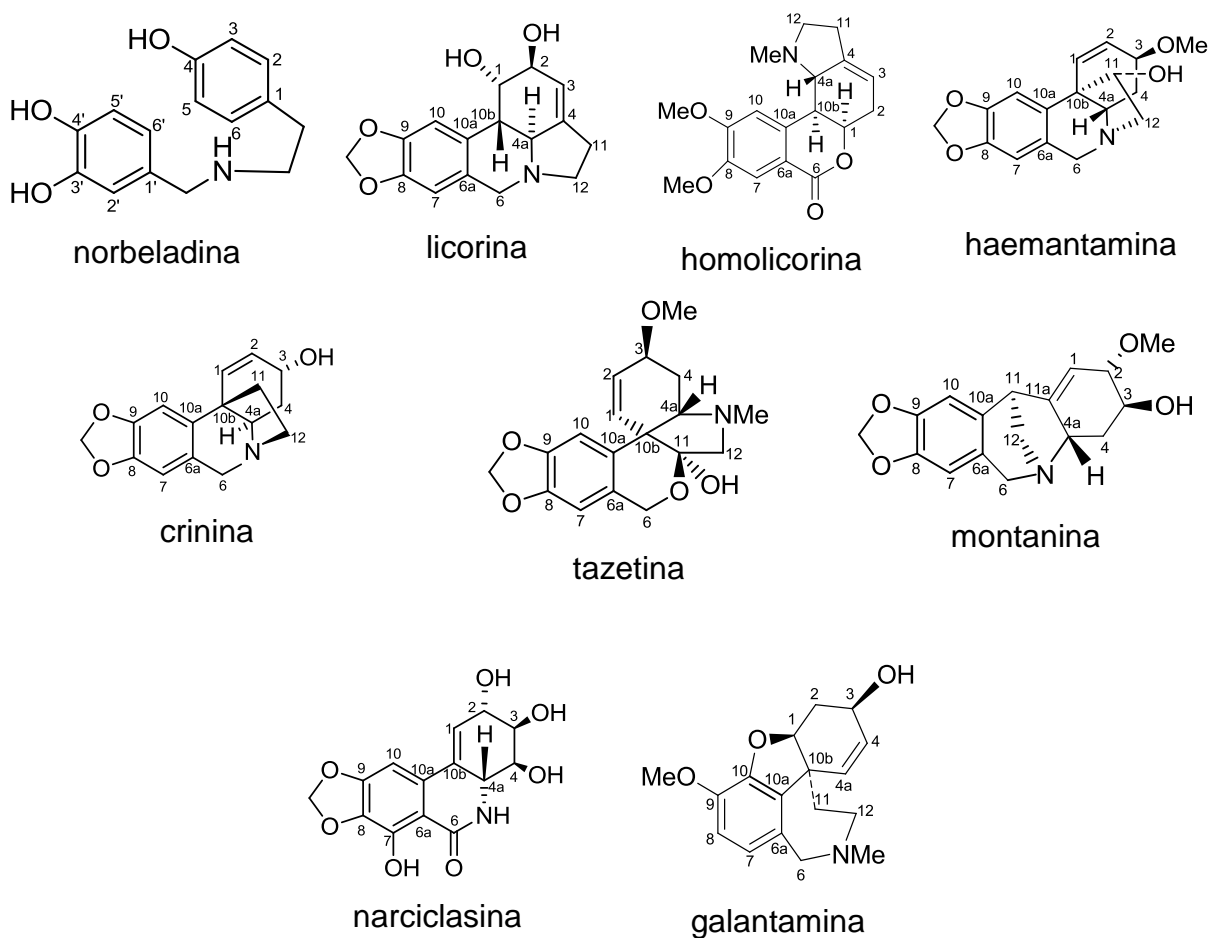
O esqueleto básico do tipo galantamina representa ser o mais estudado do ponto de vista biológico, devido ao fato do alcaloide galantamina ser o único representante da família Amaryllidaceae aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico; neste caso, para os estágios de leve a moderado da doença de Alzheimer. A galantamina apresenta um dos maiores potenciais inibição da enzima acetilcolinesterase dentro dos alcaloides de Amaryllidaceae, sendo ainda capaz de atuar como modulador alostérico positivo dos receptores nicotínicos pré- e pós-sinápticos. As duas ações, em conjunto, facilitam os processos de transmissão sináptica, sendo este mecanismo apenas confirmado para este composto. Esta modulação também inibe a formação de placas  $\beta$ -amilóides (MAELICKE et al., 2001; MATHARU et al., 2009; BASTIDA et al., 2011).

Narciclasina também é mais um esqueleto básico característico de Amaryllidaceae, tendo sido isolado recentemente em espécies do gênero *Hippeastrum*. Os derivados de narciclasina são comumente purificados de espécies de *Narcissus* e *Hymenocallis*, encontradas na Europa e na América Central, respectivamente. A narciclasina e seus derivados, como a pancratistatina, têm ganhado grande destaque ao longo dos mais recentes anos, sendo considerado o esqueleto básico de Amaryllidaceae mais importante como agente antineoplásico e propriedades anticâncer. O alcaloide narciclasina, por exemplo, inibe o crescimento de células HeLa, possui atividade contra leucêmica, sendo ativo frente à um grande número de linhagens tumorais (BASTIDA, LAVILLA; VILADOMAT, 2006; BASTIDA et al., 2011; CARVALHO et al., 2015).

Atualmente, avalia-se a possibilidade de administração de narciclasina em casos de tumores cerebrais, onde os efeitos benéficos podem sobrepor os riscos de sua toxicidade (VAN GOITSENOVEN et al., 2012).

Na Figura 6 estão representadas as estruturas químicas dos nove tipos de alcaloides da família Amaryllidaceae.

Figura 6 - Estrutura química dos alcaloides típicos da família Amaryllidaceae



Fonte: Batisda et al. (2011).

As expressivas atividades biológicas relacionadas anteriormente entre os alcaloides de Amaryllidaceae e a grande urgência em pesquisar e desenvolver novos fármacos, eficazes e seguros para o tratamento da CA justifica o estudo das espécies de Amaryllidaceae, especialmente por tratar-se de uma potencial fonte natural de alcaloides biologicamente ativos e, ao fato de, ter raros trabalhos na literatura científica que envolva pesquisas esta família botânica e o gênero *Acanthamoeba*.

Desta forma, a proposta deste presente trabalho foi de realizar testes com frações alcaloídicas de 12 espécies de Amaryllidaceae e do alcaloide licorina para avaliar sua atividade anti-*Acanthamoeba castellanii*.

A Figura 7 demonstra três espécies de Amaryllidaceae estudadas neste trabalho.

Figura 7 - Espécies do gênero *Hippeastrum* estudadas neste trabalho



(a) *Hippeastrum puniceum*



(b) *Hippeastrum canastrense*



(c) *Hippeastrum diniz-cruzae*

Fonte: Imagens cedidas pelo professor Dr. Warley de Souza Borges do Laboratório de Produtos Naturais/UFES

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Investigar a atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* de frações alcaloídicas de diferentes espécies da família Amaryllidaceae e da licorina.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial anti-*Acanthamoeba castellanii* de frações alcaloídicas de diferentes espécies de Amaryllidaceae em culturas de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*, em diferentes concentrações, e selecionar os extratos que apresentaram alto potencial amebicida e eficácia concentração dependente;
- Determinar o  $IC_{50}$  das frações alcaloídicas que apresentaram eficácia concentração dependente;
- Comparar a atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* da licorina com a da clorexidina, em diferentes concentrações para avaliar o potencial amebicida deste alcaloide e determinar se há eficácia concentração dependente;
- Determinar o  $IC_{50}$  da licorina;
- Avaliar o efeito citotóxico das frações alcaloídicas da família Amaryllidaceae e da licorina sobre as células de mamíferos MDCK (Madin-Darby Canine Kidney);
- Determinar o  $CC_{50}$  das frações alcaloídicas da família Amaryllidaceae e da licorina;
- Calcular Índice de Seletividade (IS) das frações alcaloídicas da família Amaryllidaceae e da licorina.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

- Clorexidina (Diglucanato de Clorexidina) 20%, C9394 25 ml. Sigma Aldrich - São Paulo, Brasil
- DMEM baixa Glicose D5623, 1000 mg.L<sup>-1</sup> de glicose e L-glutamina, Sigma Aldrich - São Paulo, Brasil
- MTT 3-(4,5-dimetil)-2,5-difeniltetrazólio, M5655, Life Technologies - São Paulo, Brasil.
- PSA (10.000 Ui.mL<sup>-1</sup> penicilina, 10mg estreptomicina e 25 µg.mL<sup>-1</sup> anfotericina B) A 5955, 100mL, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil.
- PYG (Proteose de peptona) RM005 500g, HiMedia – Mumbai, Índia.
- Soro Bovino Fetal – estéril e inativado, Vitrocell Embriolife – São Paulo, Brasil.
- Tripsina (0,05%) – EDTA (0,02%), S59417/ 500 ml, Sigma Aldrich - São Paulo, Brasil.

### 4.2 Material vegetal

As amostras das frações alcaloídicas testadas neste trabalho foram adquiridas de espécies pertencentes à família Amaryllidaceae; sendo obtidas a partir de folhas e bulbos de cada espécie por meio de técnicas que priorizaram a extração, ao máximo, dos compostos bioativos destes exemplares botânicos. Todo o material vegetal testado foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Warley de Souza Borges, do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Dentre as espécies testadas, listamos 12 espécies de Amaryllidaceae:

- *Griffinia gardneriana*;
- *Habranthus itaobinus*;
- *Habranthus sylvaticus*;
- *Hippeastrum brazilianum*;
- *Hippeastrum canastrense*;
- *Hippeastrum diniz-cruzae*;

- *Hippeastrum puniceum*;
- *Hippeastrum sanfranciscanum*;
- *Hippeastrum stylosum*;
- *Hippeastrum striatum*;
- *Hippeastrum goianum*;
- *Crinum giganteum*.

Além do alcaloide licorina, que também foi testado como um constituinte ativo comum nos membros desta família.

Desta forma, foram estudadas neste trabalho 22 amostras de frações alcaloídicas de 12 espécies de Amaryllidaceae e o alcaloide licorina com o intuito de avaliar seus potenciais amebicidas.

#### 4.3 Coleta e identificação do material vegetal

As espécies de Amaryllidaceae foram coletadas em diversas partes do Brasil e contou-se com a participação do Prof. Dr. Anderson Alves Araújo do Centro Universitário do Norte do Espírito Santo (CEUNES), da Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Dias Thomaz da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e da Dra. Renata Souza de Oliveira da Universidade de São Paulo (USP-SP) para a coleta, identificação e herborização do material vegetal. Os dados e as coordenadas da coleta (GPS) foram armazenados para coletas futuras e todo material coletado foi depositado no herbário da UFES (APÊNDICE B).

O nome das espécies, quantidade coletada, local da coleta e sigla correspondente no trabalho estão demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1 – Espécies de Amaryllidaceae estudadas com local da coleta, parte coletada, sigla utilizada no trabalho e número de registro em herbário

ESPÉCIES	LOCAL DA COLETA	PARTE DA PLANTA	SIGLA	HERBÁRIO
<i>Griffinia gardneriana</i>	Catimbau - PE	BULBOS	F 1	UFP - 43016
		FOLHAS	F 8	
<i>Habranthus itaobinus</i>	Catimbau - PE	BULBOS	F 9	VIES - 38995
		FOLHAS	F 7	
<i>Habranthus sylvaticus</i>	Catimbau - PE	BULBOS	F 10	VIES- 38996
		FOLHAS	F 2	

ESPÉCIES	LOCAL DA COLETA	PORTE DA PLANTA	SIGLA	HERBÁRIO
<i>Hippeastrum brazilianum</i>	Forno Grande - ES	BULBOS	F 11	VIES - 39496
		FOLHAS	F 3	
<i>Hippeastrum canastrense</i>	Serra da Canastra - MG	BULBOS	F 12	VIES - 35305
		FOLHAS	F 4	
<i>Hippeastrum diniz-cruzae</i>	Serra da Canastra - MG	BULBOS	F 6	VIES - 39497
		FOLHAS	F 5	
<i>Hippeastrum puniceum</i>	Venda Nova do Imigrante - ES	FOLHAS	F 18	VIES - 39569
		BULBOS	F 19	
<i>Hippeastrum sanfranciscanum</i>	Serra da Canastra - MG	BULBOS	F 14	VIES - 35303
		FOLHAS	F 15	
<i>Hippeastrum stylosum</i>	Catimbau - PE	BULBOS	F 13	UFP - 45305
<i>Crinum giganteum</i>	Campus UFES – Vitória -ES	FOLHAS	F 16	VIES - 39506
		BULBOS	F 17	
<i>Hippeastrum striatum</i>	Alegre - ES	FOLHAS	F 20	VIES - 39493
		BULBOS	F 21	
<i>Hippeastrum goianum</i>	Brasília - DF	BULBOS	F 22	VIES - 39499

#### 4.4 Obtenção das frações alcaloídicas

Folhas e bulbos das espécies vegetais coletadas foram secas em estufa de circulação de ar a 40°C e pulverizadas. Foi adicionado a cada material vegetal seco, metanol p.a. para maceração (5 g%), por três vezes, tendo duração de 48 horas cada processo. A cada maceração, o extrato bruto foi seco, reunido e adicionado ácido sulfúrico diluído (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% v/v), realizando partições com auxílio de éter dietílico (Et<sub>2</sub>O) por três vezes e acetato de etila (AcOEt) por duas vezes, com o objetivo de extrair a matéria neutra, mucilagem, clorofila, ácidos graxos e polifenóis (flavonoides, chalconas, antocianidinas e etc).

Em seguida, a solução foi alcalinizada com auxílio de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) (25%) até pH 9-10 e foram realizadas cinco partições com auxílio do AcOEt o que resultou na fração alcaloídica purificada. Esta mesma fração foi dessecada com auxílio de sulfato de sódio anidro e submetida a evaporador rotatório, antes de ser pesada, identificada e enviada para os testes amebicidas.



#### 4.5 Obtenção do alcaloide licorina

Através da ressuspensão da fração alcaloídica de uma espécie de *Hippeastrum* em solvente orgânico, ocorreu a precipitação de forma espontânea de um composto que exibia a coloração branca. Depois de isolado, este composto foi solubilizado em metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para a análise de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN- $^1\text{H}$ ), equipamento Varian 400 MHz, com sonda 5 mm ATB BroaBand  $^1\text{H}/^{19}\text{F}/\text{X}$  e TMS como padrão de referência. O espectro de RMN- $^1\text{H}$  deste composto foi comparado aos espectros de hidrogênio registrados na literatura e verificou-se que tratava do alcaloide licorina. Então este alcaloide foi pesado, identificado e enviado para os testes amebicidas.

#### 4.6 Preparação da solução de frações alcaloídicas para testes

Após o recebimento das amostras dos extratos devidamente identificadas pelo Laboratório de Produtos Naturais da UFES foi realizada a solubilização destes extratos em água destilada estéril, para obter uma solução diluída e homogênea de cada extrato. Inicialmente as amostras foram homogeneizadas, durante dois minutos num agitador de solução, em seguida foram submetidas à ultrassonicação em aparelho ultrassônico durante quinze minutos a temperatura de 40 °C para intensificar o processo de homogeneização da amostra. Após este procedimento, as amostras foram novamente homogeneizadas, por mais dois minutos, em agitador de solução. Foram feitos cálculos de diluição (v/v) envolvendo as soluções dos extratos iniciais e o meio PYG (2% proteose de peptona, 0,2% extrato de levedura e 1,8% de glicose) como diluente, a fim de se obter soluções testes dos extratos nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (EL-SAYED et al., 2012) em meio PYG para ser testado frente aos trofozoítos de *Acanthamoeba castellani*.

#### 4.7 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Uma alíquota da fração alcaloídica purificada foi ressuspendida em metanol (grau CLAE) chegando-se a uma concentração de 1000 ppm ( $1\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ ). Esta

amostra foi filtrada (filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ ) e posteriormente analisada por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) em cromatógrafo CG-17A Shimadzu, modelo GC-EM QP 5000.

#### 4.8 Isolado de *Acanthamoeba*

Um isolado axênico de *Acanthamoeba castellanii* identificado como ALX, Grupo II, T4 (DUARTE et al., 2013) originária da raspagem de córnea de um paciente com ceratite amebiana (CA) associada ao uso de lente de contato proveniente do Departamento de Oftalmologia do Hospital Cassiano Antônio de Moraes da Universidade Federal do Espírito Santo foi utilizada como cepa referência para se obter as formas trofozoítas da ameba para a realização do ensaio de atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* *in vitro*. (Comitê de Ética - ANEXO I)

#### 4.9 Cultura de trofozoítos

Formas vegetativas axênicas de *Acanthamoeba castellanii* foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25cm<sup>3</sup> em meio PYG (2% protease de peptona, 0,2% extrato de levedura e 1,8% glicose) (SCHUSTER, 2002) e mantidas a 28°C em estufa, a fim de se obter trofozoítos viáveis para o experimento. Ao atingirem a fase de crescimento exponencial, entre 24 e 48 horas, foram analisados em microscópio de luz invertido e avaliados quanto a sua viabilidade pelo uso da solução corante de azul de tripano (Sigma Aldrich) a 0,5%, para que assim fosse obtida uma cultura, com no mínimo, 95% de viabilidade entre trofozoítos avaliados. Após a verificação da viabilidade, foi feita uma contagem utilizando a câmara de Neubauer para que fosse alcançada uma solução final, de trofozoítos em meio PYG, com densidade de  $1,0 \times 10^6$  trofozoítos.mL<sup>-1</sup> (TEPE et al., 2012). Estes trofozoítos foram utilizados imediatamente para os testes.

#### 4.10 Ensaio da atividade anti-*Acanthamoeba castellanii*

A atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* *in vitro* das frações alcaloídicas sobre as culturas axênicas de trofozoítos foi realizada de acordo com o método descrito por Heredero-Bermejo e colaboradores (2013) com algumas modificações.

Inicialmente, ocorreu o plaqueamento, em microplaca de cultivo celular de 96 poços, de 100 µL da cultura dos trofozoítos viáveis em meio PYG ( $1,0 \times 10^6$ . mL<sup>-1</sup>), quando a placa permaneceu em repouso por trinta minutos (POLAT et al., 2007). Depois foram adicionados 100 µL da solução da fração alcaloídica e da licorina que foram testadas. Após o término do plaqueamento, a placa foi selada e incubada a 28 °C em estufa. O ensaio foi realizado em um período de incubação de 48 horas para a avaliação das frações alcaloídicas e de 24, 48 e 72 horas para os testes da licorina.

Após a incubação, foram adicionados a cada poço, 20 µL da solução do corante 3-(4,5-dimetil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983) na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> para avaliar a viabilidade dos trofozoítos em cada poço. A placa foi incubada a 28 °C em estufa por mais quatro horas, quando todo o conteúdo dos poços foi removido e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de Formazan. A placa foi homogeneizada e submetida à leitura em leitor de microplaca de Elisa (i-Mark, Bio Rad Laboratories, Washington, USA) em filtro de 540 nm e com um filtro de referência de 620 nm (SAUTER et al., 2011), para se obter um valor de absorbância.

Foi adotado como controle positivo a clorexidina a 0,02% por ser o fármaco de referência adotado para o tratamento da ceratite amebiana (EL-SAYED et al., 2012). O meio PYG e a água destilada estéril foram adotados como controles negativos e foi feito branco com meio PYG e a solução da fração alcaloídica testada, sem os trofozoítos. Cada amostra foi testada em quadruplicata em quatro dias diferentes.

#### 4.11 Desenho experimental da atividade anti-*Acanthamoeba castellanii*

##### Primeira etapa seletiva das frações alcaloídicas

Inicialmente, foi realizado um *screening* das 22 amostras das frações alcaloídicas na concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , para identificar as amostras que teriam potencial para inibir os trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*. Desta forma, todas as frações que apresentaram uma porcentagem de inibição igual ou superior a 30% sobre os trofozoítos foram selecionadas.

##### Segunda etapa seletiva das frações alcaloídicas

As amostras que apresentaram uma porcentagem de inibição igual ou superior a 30%, ainda foram testadas nas concentrações de 500 e  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para avaliar se, com o aumento da concentração também haveria um aumento no nível de inibição sobre os trofozoítos, identificando assim as amostras que apresentariam uma eficácia dependente da concentração.

##### Frações alcaloídicas selecionadas

As frações alcaloídicas que apresentaram uma eficácia concentração dependente foram testadas na concentração de  $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para identificar aquelas que apresentariam um alto poder amebicida, ou seja, até 100% de inibição sobre as culturas de *Acanthamoeba*.

##### Análise por CG-EM

Para as frações que apresentaram alto poder amebicida, ou seja, 100% de inibição sobre as culturas de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* foram realizadas análise por CG-EM para identificar os alcaloides de Amaryllidaceae que estavam presentes nessas frações alcaloídicas.

## Licorina

A licorina foi testada nas concentrações de 100, 200 e 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , em 24, 48 e 72 horas para avaliar seu potencial amebicida sobre os trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* e verificar se com o aumento da concentração e do tempo de exposição também haveria um aumento na porcentagem de inibição sobre os trofozoítos. Os resultados foram comparados com a clorexidina 0,02%, equivalente a concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Cada teste foi realizado em quadruplicata em quatro dias diferentes.

### 4.12 Origem das células

As células de mamíferos *Madin-Darby canine Kidney* - MDCK (NBL2) foram originárias do rim de caninos da espécie *Canis familiaris* e adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) para a realização do teste de citotoxicidade das frações alcaloídicas das espécies em estudo.

### 4.13 Cultura das células

As células MDCK foram cultivadas em meio *Dulbecoo's Modified Eagle Medium* (DMEM) de baixa concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de PSA (Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina). Estas células foram subcultivadas em garrafas de cultura de 25  $\text{cm}^3$  e armazenadas á 37 °C em estufa incubadora de CO<sub>2</sub>, a 5% até que se conseguiu as culturas de células viáveis para o experimento (BCRJ MDCK, 2014). Em seguida, as células foram removidas dos frascos de cultura por digestão enzimática pela adição da solução de 0,05% tripsina - 0,02% EDTA e foi avaliada a viabilidade celular pelo uso do corante azul de tripano a 0,5%. Após a avaliação em microscópio de luz invertido, foram contadas em câmara de Neubauer a fim de se obter uma solução de concentração final de  $4,0 \times 10^5$  células. $\text{mL}^{-1}$  (SAUTER et al, 2011). Esta solução foi utilizada imediatamente para os testes de citotoxicidade.

#### 4.14 Ensaio de citotoxicidade

O efeito citotóxico *in vitro* das frações alcaloídicas sobre as células de mamíferos MDCK foi realizado de acordo com o método descrito por Sauter e colaboradores (2011) com algumas modificações. Resumidamente, as células MDCK -NBL2 foram cultivadas em meio DMEM e plaqueadas em microplacas de cultivo celular de 96 poços, na concentração de  $4 \times 10^4$  células por poço em 100  $\mu\text{L}$  de meio DMEM. A placa foi mantida a 37 °C em estufa, sob uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e após 24 horas, o meio DMEM foi cuidadosamente removido dos poços. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de meio DMEM novo e 100  $\mu\text{L}$  da solução das frações alcaloídicas, diluídas no mesmo meio das células, nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foram plaqueadas em cada poço. Também foi avaliada a licorina, nas concentrações de 100, 200 e 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e a clorexidina 0,02%. A placa foi novamente incubada a 37 °C após a adição das soluções testes, sob uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , por um período de 48 horas.

Após a incubação, todo o conteúdo da placa foi removido e adicionados 180  $\mu\text{L}$  de meio DMEM novo com 20  $\mu\text{L}$  do corante 3-(4,5-dimetil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983), na concentração de 5  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Após 4 horas de incubação, foi removido todo o conteúdo dos poços e 100  $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados a cada poço para solubilização dos sais de Formazan. A placa foi homogeneizada e submetida à leitura num leitor de microplaca de Elisa (i-Mark, Bio Rad Laboratories, Washington, USA) em filtro de 540 nm e com um filtro de referência de 620 nm (SAUTER et al., 2011). Foram utilizados como controles o meio DMEM e a água destilada estéril e utilizado como branco o meio DMEM e a solução da fração alcaloídica, sem as células. Cada amostra foi testada em quadruplicata em quatro dias diferentes.

Todos os cálculos da porcentagem de viabilidade celular foram feitos de acordo com os valores de absorbância emitidos pelo leitor de microplaca de Elisa, sendo que quanto maior foi o valor da absorbância registrada pelo leitor maior foi a viabilidade celular de cada poço.

#### 4.15 Método de análise dos resultados

Todos os cálculos da porcentagem de viabilidade celular foram feitos de acordo com os valores de absorbância emitidos pelo leitor de microplaca de Elisa, sendo que, quanto maior a absorbância, maior a viabilidade celular e menor a inibição no poço analisado. Com base nesses parâmetros que foram realizados todos os cálculos deste trabalho (ISO/EN10993-5, 2009).

Todas as leituras foram realizadas no Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais (UFES) e a avaliação da eficácia de cada fração alcaloídica foi realizada pela análise dos valores de absorbância, onde a absorbância do poço contendo apenas meio PYG com os trofozoítos e o poço contendo apenas o meio DMEM com as células foi considerada como 100% de viabilidade para os cálculos. Os resultados expressos foram calculados como porcentagens do controle que apresentava os 100% de viabilidade (LUKÁČ et al., 2013). O cálculo da porcentagem de inibição das frações alcaloídicas foi feita segundo Andrade e colaboradores, 2007, utilizando as equações:

$$PV = \frac{AA - AB}{AC} \times 100 \quad (I)$$

$$PI = 100 - PV \quad (II)$$

onde:

*PV* = Porcentagem de Viabilidade;

*AA* = Absorção da Amostra;

*AB* = Absorção do Branco;

*AC* = Absorção do Controle;

*PI* = Porcentagem de Inibição.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e desvios-padrão; e com estes valores de média de viabilidade e inibição das frações alcaloídicas foram plotados todos os gráficos do trabalho. E para determinar a concentração das frações alcaloídicas e da licorina que inibiram 50% da população de amebas ( $IC_{50}$ ) e a concentração das frações alcaloídicas e da licorina que foi citotóxica para 50% da população das células ( $CC_{50}$ ) foram construídos para cada uma das amostras, um

gráfico da porcentagem de inibição de trofozoítos ou células *versus* concentração em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  por meio da Equação da Reta. A determinação do  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{CC}_{50}$  foi obtida por meio da análise de regressão linear no programa *Microsoft Excel*, onde para cada fração alcaloídica analisada foram utilizadas concentrações de 250 a 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e para a licorina, concentrações de 100 a 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O cálculo do índice de seletividade (IS) foi obtido pela razão entre o valor do  $\text{CC}_{50}$  e o valor do  $\text{IC}_{50}$ .



## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi aplicado o teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com o teste de *Bonferroni*, como teste *a posteriori* no programa estatístico *GraphPad Prism 5.0*. O teste de Análise de Variância (ANOVA) foi utilizado porque neste estudo analisamos vários grupos representados pelas diferentes concentrações das frações alcalóidicas testadas e da licorina, sendo classificadas como variáveis qualitativas, e uma variável quantitativa representada pela porcentagem de trofozoítos e células viáveis. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo e  $p < 0,001$  como um valor estatisticamente muito significativo, sendo que o valor de  $p < 0,05$  foi o adotado como estatisticamente significativo para este trabalho.

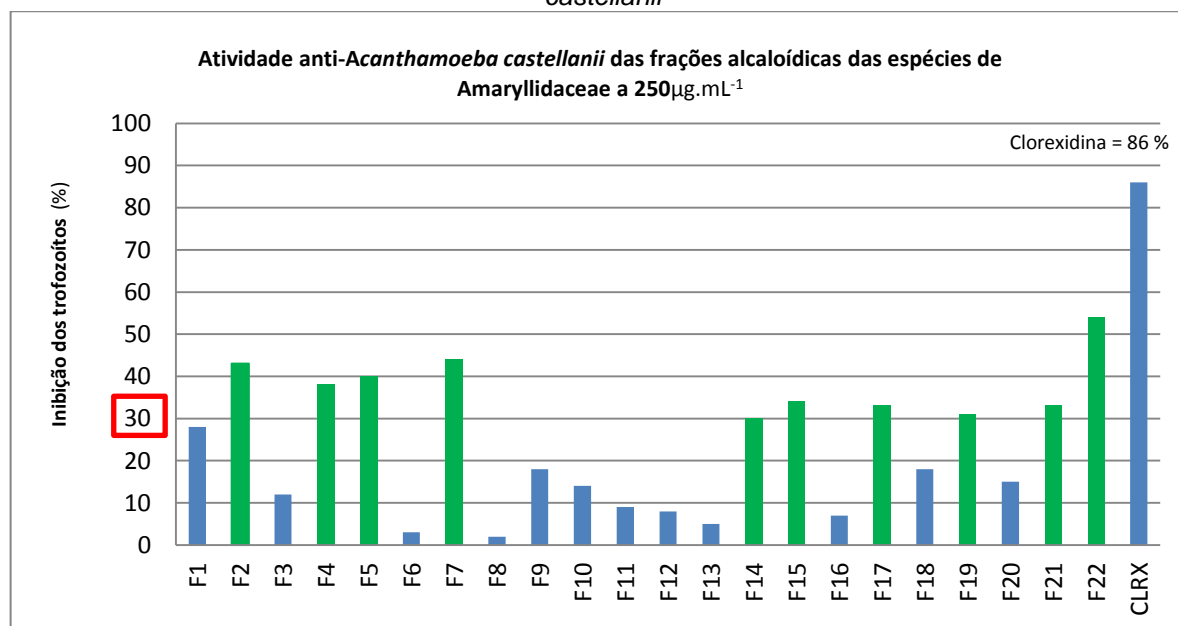
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Primeira etapa de seleção das frações alcaloídicas

Nesta primeira etapa seletiva do trabalho, 22 amostras das frações alcaloídicas foram testadas na concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e selecionadas apenas as que apresentaram um valor de média de inibição maior ou igual a 30% sobre os trofozoítos de *Acanthamoeba castellani*. De acordo com os dados da Figura 8, as frações F1, F3, F6, F8, F9, F10, F11, F12, F13, F16, F18, F20 e F22 não apresentaram valores de inibição iguais ou superiores a 30%, portanto foram eliminados dos testes. Abaixo segue a lista com as 10 amostras selecionadas e os valores de inibição de cada fração:

- F2 - *Habranthus sylvaticus* – bulbos = 43%
- F4 - *Hippeastrum canastrense* – bulbos = 38%
- F5 - *Hippeastrum diniz-cruzae* – bulbos = 40%
- F7 - *Habranthus itaobinus* – bulbos = 44%
- F14 - *Hippeastrum sanfranciscanum* – folhas = 30%
- F15 - *Hippeastrum sanfranciscanum* – bulbos = 34%
- F17 – *Crinum giganteum* – bulbos = 33%
- F19 - *Hippeastrum puniceum* (Venda Nova - ES) – bulbos = 31%
- F21 - *Hippeastrum striatum* – bulbos = 33%
- F22 - *Hippeastrum goianum* – bulbos = 54%

Figura 8 - Inibição das 22 frações alcalóidicas de Amaryllidaceae sobre trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*



Nota: Dados numéricos APÊNDICE A

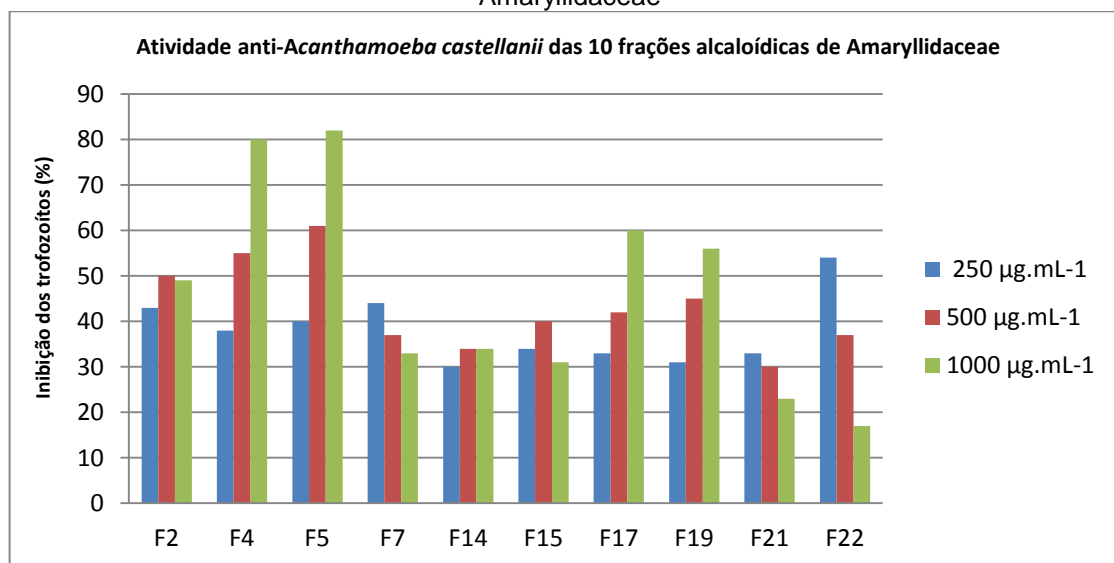
## 6.2 Segunda etapa de seleção das frações alcalóidicas

Nesta segunda etapa seletiva do trabalho 10 frações alcalóidicas foram testadas nas concentrações de 500 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup> e foram comparados os valores das médias de inibição das frações para identificar as que apresentaram um aumento no valor de inibição paralelo ao aumento das concentrações, para identificar a presença de eficácia concentração dependente entre as amostras avaliadas.

De acordo com os resultados da Figura 9 as frações F2, F7, F14, F15, F21 e F22 não apresentaram o aumento no valor de inibição paralelo ao aumento da concentração, por isto foram eliminadas. Abaixo segue a lista das frações que foram selecionadas:

- F4 - *Hippeastrum canastrense* – bulbos;
- F5 - *Hippeastrum diniz-cruzae* – bulbos;
- F17 - *Crinum giganteum* – bulbos;
- F19 - *Hippeastrum puniceum* (Venda Nova - ES) – bulbos.

Figura 9 - Inibição dos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* após exposição às 10 frações de Amaryllidaceae



### 6.3 Frações alcaloídicas selecionadas

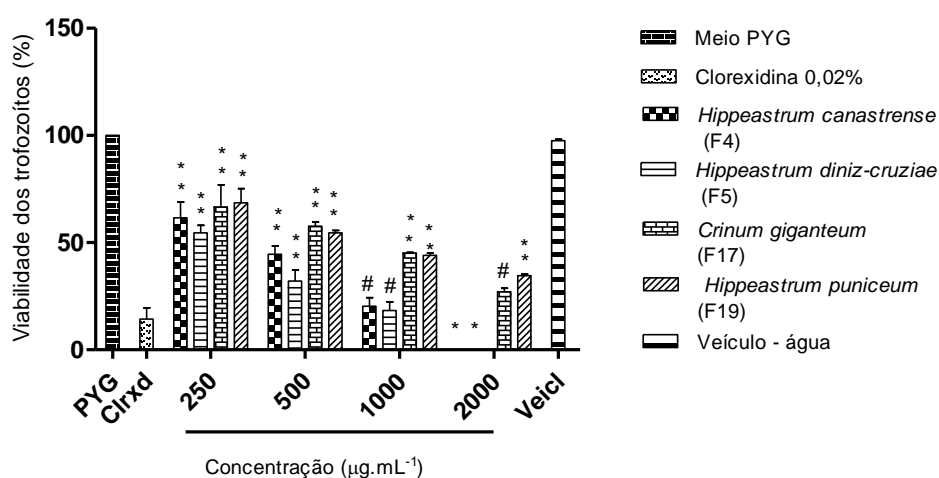
Mediante os resultados obtidos na primeira e segunda etapa de testes, as espécies *Hippeastrum canastrense*, *Hippeastrum diniz-cruzae*, *Crinum giganteum* e *Hippeastrum puniceum* foram ainda submetidas a mais um teste com o objetivo de obter alguma amostra que inibisse 100% dos trofozoítos de *Acanthamoeba*. Com este objetivo estas amostras foram avaliadas na concentração de 2000 µg.mL<sup>-1</sup>. As frações das espécies *Hippeastrum canastrense* e *Hippeastrum diniz-cruzae* alcançaram uma porcentagem de 100% inibição sobre os trofozoítos e ainda apresentaram uma eficácia amebicida superior à da clorexidina 0,02%, controle positivo.

O Figura 10 representa a porcentagem de viabilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* após exposição às frações F4, F5, F17 e F19 nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2000 µg.mL<sup>-1</sup>. Como também observado na Figura 10, o veículo utilizado para solubilizar as frações não apresentou interferência sobre as culturas de *Acanthamoeba* e nem sobre os resultados registrados das frações. Pode-se contemplar que a maioria das concentrações das frações avaliadas quando foram comparadas a clorexidina apresentou um valor de p estatisticamente muito significativo ( $p < 0,001$ ), demonstrando que este fármaco foi mais eficaz do que as amostras das frações testadas. Isto só não foi observado para as frações F4 e F5 (1000 µg.mL<sup>-1</sup>) e a F17 (2000 µg.mL<sup>-1</sup>) que não apresentaram

diferença estatisticamente significativa em comparação a este fármaco, mostrando com isto que apresentaram eficácia compatível com a mesma. E ainda, as frações F4 e F5 ( $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) quando foram comparadas com a clorexidina apresentaram um valor de p estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), informando que estas frações apresentaram uma atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* superior à observada neste fármaco.

Figura 10 – Viabilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* após a exposição às frações F4, F5, F17 e F19

**Atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* das frações alcalóidicas de Amaryllidaceae durante 48h**



\* valor de  $p < 0,05$  com diferença estatisticamente significativa;

\*\* valor de  $p < 0,001$  com diferença estatisticamente muito significativa;

# valor de p não estatisticamente significativo, todos em comparação a clorexidina (controle positivo).

## 6.4 Análise por CG-EM

A análise feita por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) das frações alcalóidicas das espécies *H. canastrense* e *H. diniz-cruzae* apontou que na espécie *H. canastrense* havia alcaloides derivados dos esqueletos básicos tipo homolicorina, licorina, galantamina, tazetina e haemantamina. Na espécie *H. diniz-cruzie* havia apenas alcaloides derivados dos esqueletos básico tipo homolicorina e licorina, como demonstra a Tabela 1

Tabela 1 - ANÁLISE POR CG-EM DAS FRAÇÕES DAS ESPÉCIES DE AMARYLLIDACEAE

Análise por CG-EM das frações alcalóidicas dos bulbos das espécies <i>Hippeastrum canastrense</i> e <i>Hippeastrum. diniz-cruzae</i>			
<i>H. canastrense</i>		<i>H. diniz-cruzae</i>	
Esqueleto tipo homolicorina	80,48%	Esqueleto tipo homolicorina	1,24%
Esqueleto tipo licorina	11,29%	Esqueleto tipo licorina	98,76%
Esqueleto tipo galantamina	4,92%	Total	100%
Esqueleto tipo tazetina	2,43%		
Esqueleto tipo haemantamina	0,88%		
Total	100%		

Fonte: Dados fornecidos pelo colaborador Dr. Jean Paulo de Andrade do Laboratório de Produtos Naturais/UFES

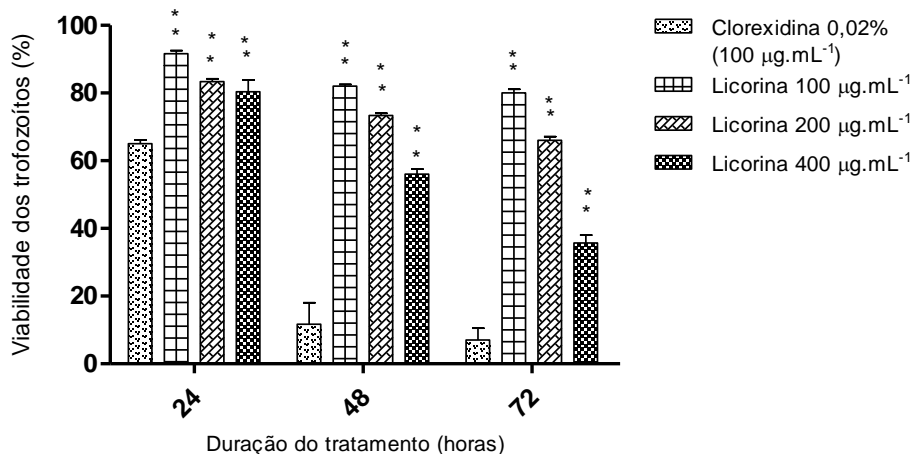
Nota: Dados análise CG-EM - APÊNDICE B

## 6.5 Licorina

Os valores de inibição das diferentes concentrações de licorina não foram superiores aos observados na clorexidina. Na mesma concentração que a clorexidina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), a licorina apresentou um valor de inibição de 8, 18 e 20%, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, enquanto a clorexidina apresentou um valor de inibição de 35, 88 e 93%, nos mesmos intervalos de tempos. Conforme mostra a Figura 11, quando se comparou a atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* da clorexidina com a mesma atividade da licorina obteve-se um valor de p estatisticamente muito significativo ( $p < 0,001$ ) em todas as concentrações e intervalos de tempos testados, informando que a clorexidina foi superior em todas as concentrações.

Figura 11 – Viabilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* após exposição à licorina e a clorexidina

Atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* da licorina- alcaloide Amaryllidaceae



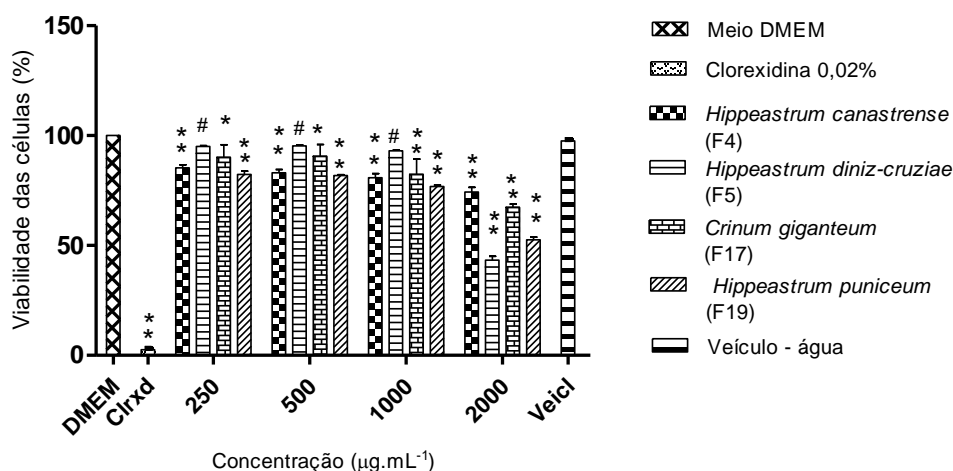
\*\* valor de  $p < 0,001$  com diferença estatisticamente muito significativa em comparação a clorexidina.

## 6.6 Atividade citotóxica das frações alcaloídicas sobre células MDCK

A citotoxicidade das frações F4- *Hippeastrum canastrense*, F5- *Hippeastrum diniz-cruzae*, F17- *Crinum giganteum* e F19- *Hippeastrum puniceum* sobre as células MDCK demonstrada na Figura 12 aponta que a fração da espécie *Hippeastrum diniz-cruzae*, nas concentrações de 250, 500 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentou baixa porcentagem de inibição (5 a 7%) sobre as culturas celulares, o que não apresentou diferença estatisticamente significativa quando foi comparado ao meio DMEM, utilizado como controle das células, informando que esta fração e o meio DMEM apresentam o mesmo efeito sobre as células. As demais frações avaliadas, *Hippeastrum canastrense*, *Crinum giganteum* e a *Hippeastrum puniceum* apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado ao meio DMEM, demonstrando que estas frações apresentaram uma citotoxicidade significativa sobre as culturas de células avaliadas. A clorexidina apresentou uma porcentagem de inibição de 97% sobre as culturas celulares, sendo este valor alto quando comparado a citotoxicidade das frações, desta forma a clorexidina apresentou-se como a substância mais citotóxica neste teste. Também foi observado que o veículo utilizado para solubilizar as frações não interferiu nos resultados obtidos sobre as culturas celulares.

Figura 12 – Viabilidade celular das culturas de MDCK após 48h de exposição às frações F4, F5, F17 e F19

### Citotoxicidade sobre células MDCK das frações alcaloídicas de Amaryllidaceae durante 48h



\* valor de  $p < 0,05$  com diferença estatisticamente significativa;

\*\* valor de  $p < 0,001$  com diferença estatisticamente muito significativa;

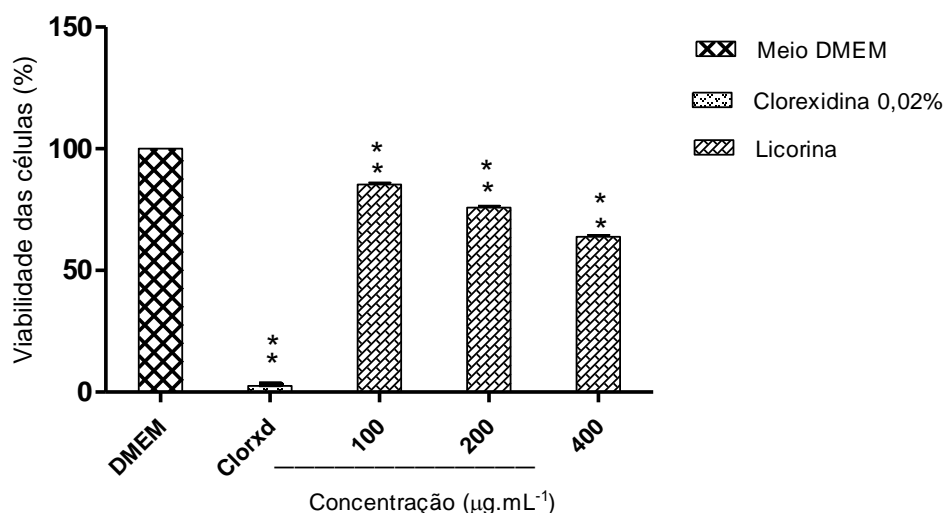
# valor de  $p$  não estatisticamente significativo, todos em comparação ao meio DMEM.

## 6.7 Atividade citotóxica da licorina sobre as células MDCK

O efeito citotóxico da licorina sobre as culturas de células de mamíferos MDCK foi concentração dependente como mostra a Figura 13, onde pode ser observado que com o aumento da concentração houve também um aumento da porcentagem de inibição sobre as células e, conseqüentemente, uma diminuição na viabilidade celular destas culturas. Todas as concentrações testadas, 100, 200 e 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado ao meio DMEM, demonstrando que todas as concentrações da licorina apresentaram citotoxicidade significativa. Porém, em comparação a citotoxicidade da clorexidina, todas as concentrações da licorina apresentaram citotoxicidade inferior a esta substância.

Figura 13 – Viabilidade celular das células MDCK após 48h de exposição à licorina

**Citotoxicidade sobre células MDCK da licorina - alcaloide de Amaryllidaceae durante 48h**



\*\* valor de  $p < 0,001$  com diferença estatisticamente muito significativa em comparação ao meio DMEM.

## 6.8 Determinação do $\text{IC}_{50}$ , $\text{CC}_{50}$ e Índice de Seletividade (IS)

Os valores de  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{CC}_{50}$  e IS das frações alcaloídicas das espécies de Amaryllidaceae e da licorina estão demonstrados na Tabela 2, onde foi observado que a espécie *Hippeastrum diniz-cruzie* apresentou o menor valor de  $\text{IC}_{50}$ , que foi de  $285,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e o maior índice de seletividade, que foi de 7,00. Esses valores



apontam que esta espécie precisaria da menor concentração da fração alcaloídica para inibir 50% da população de amebas, e que com este valor no índice de seletividade, indica que esta espécie foi sete vezes menos tóxica para as células de mamíferos, sendo mais seletiva sobre as amebas.

Tabela 2 - VALORES DE IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> E IS DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE AMARYLLIDACEAE E DA LICORINA

<b>Espécies Amaryllidaceae</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>CC<sub>50</sub></b>	<b>IS</b>
<i>Hippeastrum canastrense</i> (F4)	389,31 µg.mL <sup>-1</sup>	2.500,02 µg.mL <sup>-1</sup>	6,42
<i>Hippeastrum diniz-cruzae</i> (F5)	285,61 µg.mL <sup>-1</sup>	1.998,27 µg.mL <sup>-1</sup>	7,00
<i>Crinum giganteum</i> (F17)	857,61 µg.mL <sup>-1</sup>	2.870,37 µg.mL <sup>-1</sup>	3,35
<i>Hippeastrum puniceum</i> (F19)	962,75 µg.mL <sup>-1</sup>	2.297,65 µg.mL <sup>-1</sup>	2,38
Licorina	468,75 µg.mL <sup>-1</sup>	596,47 µg.mL <sup>-1</sup>	1,27

## 7 DISCUSSÃO

É bastante discutida na literatura a grande dificuldade que existe no tratamento dos pacientes com as infecções causadas por *Acanthamoeba*, Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e Ceratite Amebiana (CA), devido à falta de um agente quimioterapêutico que seja totalmente eficaz contra este protozoário. Em especial, quando se refere ao tratamento da Ceratite Amebiana (CA), existe uma grande resistência apresentada por este parasita aos fármacos e uma elevada toxicidade causada às células oculares pelos vários agentes terapêuticos utilizados como, por exemplo, antibióticos, antissépticos, antifúngicos, antiprotozoários e antivirais (ALVARENGA; FREITAS; HOFLING-LIMA, 2000; TUNER et al., 2000; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES et al., 2013; KUZMA et al., 2015; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Com o intuito de transpor este grande obstáculo do tratamento, várias pesquisas estão sendo realizadas para encontrar um agente terapêutico que seja eficaz para a CA, atuando prioritariamente sobre *Acanthamoeba*, e que provoque o mínimo possível de danos às células da córnea.

Os valores de inibição encontrados nesta pesquisa, revelam que as frações alcaloídicas das espécies *Hippeastrum canastrense*, *Hippeastrum diniz-cruzae*, *Crinum giganteum* e *Hippeastrum puniceum* possuem atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* frente a culturas de *Acanthamoeba*, e demonstram que estas frações apresentam um efeito concentração dependente, ou seja, o aumento da porcentagem de inibição sobre as culturas de *Acanthamoeba* foi resultante do aumento da concentração da fração avaliada. Em especial, as espécies *Hippeastrum canastrense* e *Hippeastrum diniz-cruzae* se destacaram das demais, por apresentar 80 e 82% de inibição, respectivamente, sobre as culturas avaliadas na concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o que demonstra que estas espécies de Amaryllidaceae apresentam um poder amebicida comparável ao observado na clorexidina que é o tratamento de referência utilizado para a CA. Sendo que ainda, estas mesmas espécies apresentaram 100% de inibição sobre as culturas na concentração de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , valor este que foi superior a atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* observada na clorexidina, que foi de 86% de inibição frente às culturas.

Estes dados acima registrados podem estar relacionados à ação dos alcaloides isoquinolínicos presentes em exemplares de Amaryllidaceae, já que é bem elucidada a presença destes compostos químicos como constituintes ativos desta família botânica. Várias pesquisas apontam as diversas atividades biológicas desencadeadas por estes alcaloides, entre as quais podemos destacar a atividade antiparasitária, descrita por pesquisadores que apontam as espécies de Amaryllidaceae e seus alcaloides como constituintes ativos contra diversos parasitas como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum*, *Trichomonas vaginalis* (LABRAÑA et al., 2002; SENER, ORHAN, SATAYAVIVAD, 2003; BASTIDA, LAVILLA; VILADOMAT, 2006; TORIIZUKA et al., 2008; GIORDANI; VIEIRA et al., 2010; OSORIO et al., 2010, KAYA et al., 2011).

Em 2010, Giordani e colaboradores avaliaram a candimina, um derivado do esqueleto básico do tipo homolicorina, frente a culturas de *Trichomonas vaginalis* e obtiveram resultados bastante promissores. A candimina foi isolada dos bulbos da espécie *Hippeastrum morelianum*, um exemplar de Amaryllidaceae, sendo esta substância o constituinte marjoritário destes bulbos. Dentre os resultados observados no estudo, foram destacadas alterações morfológicas marcantes nos trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* quando estes foram avaliados pela microscopia eletrônica (ME), apresentando perda da forma original com algumas fissuras em sua superfície, sendo que este dano foi dependente do tempo de exposição á candimina. Também foi observada na microscopia eletrônica de transmissão (MET) uma vacuolização citoplasmática intensa nestes trofozoítos, possuindo até mesmo alguns vacúolos com características autofágicas. E ainda foi comprovada uma interferência no ciclo celular deste parasita, onde a candimina foi a responsável pela inibição do ciclo na fase G<sub>2</sub>, após 24h de tratamento, culminando no desenvolvimento de mecanismos intracelulares que originaram a morte celular no *T. vaginalis* (GIORDANI; VIEIRA et al., 2010).

*Acanthamoeba* apresenta uma fase de crescimento exponencial, dividindo seu ciclo celular nas fases G<sub>1</sub>, S(síntese), G<sub>2</sub> e M(mitose), sendo a fase G<sub>2</sub> correspondente a 90% do ciclo. O grande predomínio da fase G<sub>2</sub> no ciclo celular da *Acanthamoeba* pontua esta fase como um mecanismo de multiplicação celular importante para a proliferação deste protozoário (BAND; MOHRLOK, 1973; STÖHR et al., 1987; BYERS et al., 1991; KHAN 2006).

A atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* observada nas espécies *Hippeastrum canastrense* e *Hippeastrum diniz-cruzae* frente *Acanthamoeba* pode estar associada ao mesmo tipo de mecanismo de inibição no ciclo celular observado no estudo de Giordani, Vieira e colaboradores (2010), já que na análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) das frações alcaloídicas dos bulbos das espécies *H. canastrense* e *H. diniz-cruzae* foi identificada a presença do esqueleto básico do tipo homolicorina em sua composição fitoquímica assim como havia na espécie *Hippeastrum morelianum*, avaliada frente ao *Trichomonas vaginalis*.

Um estudo realizado em 2012 por El-Sayed e colaboradores, onde estes pesquisadores apontaram a espécie *Pancratium maritimum*, um exemplar de Amaryllidaceae, como uma espécie com poder amebicida frente a culturas *Acanthamoeba*. Em testes *in vitro*, o *Pancratium maritimum* na concentração de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com uma exposição de 48h sobre as culturas, apresentou um valor de inibição de 75%, e somente na concentração de 200.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com uma exposição de 72h, alcançou um valor de inibição de 100% sobre as culturas avaliadas. Quando se compara as concentrações e os valores de inibição registrados no estudo de El-Sayed e colaboradores (2012) com as concentrações e valores de inibição das espécies *Hippeastrum canastrense* e *Hippeastrum diniz-cruzae*, 100% de inibição na concentração de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  no período de 48 horas de exposição, é notória que a concentração utilizada no gênero *Hippeastrum* para alcançar os 100% de inibição é 100 vezes menor do que a utilizada pelo *Pancratium maritimum*. Mediante estes valores, pode-se afirmar que as espécies do gênero *Hippeastrum* avaliadas neste trabalho apresentaram uma eficácia considerável sobre as culturas de *Acanthamoeba* já que, com apenas 1% da concentração do *P. maritimum* e com a redução de 33,3% do tempo de exposição alcançaram um alto poder amebicida.

Estes resultados amebicidas observados nas espécies *Pancratium maritimum*, *Hippeastrum canastrense* e *Hippeastrum diniz-cruzae* se somam e afirmam, dando fortes indícios de que os alcaloides da família Amaryllidaceae, além das muitas atividade biológicas já associadas a eles, também desencadeiam uma função muito importante na atividade amebicida frente a *Acanthamoeba*. E isto é muito válido do ponto de vista de impulsionar novas pesquisas nesta área para que se torne melhor elucidadas esta atividade biológica, já que são raros os estudos da

atividade amebicida nesta família botânica. Em 2014, Badria e colaboradores listaram várias espécies botânicas que apresentaram alta atividade amebicida e baixa toxicidade, sendo estas identificadas como *Thymus sipyleus*, *Salvia staminea*, *Kaempferia galanga*, *Cananga odorata*, *Teucrium polium*, *Teucrium chamaedrys*, *Pastinaca armenea*, *Inula oculus-christi*, *Peucedanum longibracteolatum*, *Rubus chamaemorus*, *Pueraria lobata*, *Solidago virgaurea*, *Solidago graminifolia*, *Pterocaulon polystachyum*, *Allium sativum*, *Arachis hypogaea*, *Curcuma longa*, *Pancratium maritimum* (Amaryllidaceae) e *Helianthemum lippii*, caracterizadas como espécies inibidoras eficazes de crescimento de *Acanthamoeba*, e algumas espécies até mais do que a terapia atualmente utilizada. Dentre estas espécies listadas, apenas um exemplar de Amaryllidaceae, o *Pancratium maritimum*, foi citado como uma espécie eficaz contra *Acanthamoeba* (BADRIA et al., 2014).

A baixa citotoxicidade é também uma característica muito importante no que diz respeito à descoberta de novos alvos terapêuticos com finalidade amebicida, pois os tratamentos atualmente utilizados para ceratite amebiana (CA) apresentam um fator muito limitante, que é a alta toxicidade e agressão às células da córnea. Os fármacos geralmente prescritos no tratamento como as biguanidas (PHMB - polihexametileno de biguanidina), as diaminas aromáticas (Brolene - isotionato de propamidina) e até mesmo os antifúngicos, como miconazol, mesmo em baixas concentrações (0,02% PHMB, 0,1% Brolene e 1% miconazol) podem apresentar efeitos colaterais significativos e desenvolver a ceratopatia tóxica. A ocorrência deste efeito colateral implica na interrupção imediata do tratamento, fazendo necessária uma mudança significativa dos medicamentos utilizados, mesmo que estes sejam bem-sucedidos (ALVARENGA; FREITAS; HOFLING-LIMA, 2000; LORENZO-MORALES et al., 2013; LORENZO- MORALES, KHAN, WALOCHNIK; 2015).

Os resultados da citotoxicidade das espécies *Hippeastrum canastrense*, *Crinum giganteum* e *Hippeastrum puniceum* obtidos neste trabalho demonstram que com o aumento da concentração houve um aumento do valor de inibição sobre as culturas de células MDCK comprovando que o efeito observado foi dependente da concentração, principalmente quando foram utilizadas as concentrações de 1000 e 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Já a espécie *Hippeastrum diniz-cruzae* nas concentrações de 250, 500 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não apresentou efeito inibitório significativo sobre as culturas avaliadas, pois nestas concentrações esta espécie se comportou com a mesma

atividade observada no meio de cultura celular, não interferindo na viabilidade celular.

Estes resultados de citotoxicidade observados nas espécies *Hippeastrum canastrense*, *Crinum giganteum* e *Hippeastrum puniceum* podem estar associados aos vários alcaloides de Amaryllidaceae presentes nos extratos destas espécies, já que estes apresentam toxicidade frente aos mais variados tipos de linhagens celulares como o melanoma murino, carcinoma pulmonar e renal, células HeLa, leucemia humana, adenocarcinoma de cólon, câncer de mama e ovário (GHOSAL et al., 1985; LIN et al., 1995; SILVA et al., 2008).

O resultado de citotoxicidade observado na espécie *H. diniz-cruzae* não é semelhante ao observado na espécie *H. canastrense* e este fato pode estar associado a diferença na composição alcaloídica dessa fração, pois a análise por CG-EM da fração do *H. diniz-cruzae* apresentou apenas os esqueletos básicos dos tipos homolicorina e licorina, enquanto a *H. canastrense* apresentou os esqueletos básicos dos tipos homolicorina, licorina, galantamina, tazetina e haemantamina. Esta variedade nos tipos de esqueletos, como no caso da *H. canastrense* confere uma maior variedade de compostos químicos a esta fração alcaloídica e com isto gera uma maior condição de citotoxicidade sobre as culturas celulares. A citotoxicidade observada na clorexidina frente às culturas celulares demonstra alto nível de citotoxicidade deste fármaco, e quando comparamos o valor de inibição da clorexidina, 97%, com os valores de inibição observados nas frações alcaloídicas, é nítido que as frações apresentaram uma porcentagem de inibição muito menor do que a observada na clorexidina, já que os valores variaram entre 5 e 51%, o que permite afirmar que as frações alcaloídicas avaliadas são menos citotóxicas que a clorexidina.

A espécie *H. diniz-cruzae* além de apresentar 100% de inibição sobre as culturas na concentração de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , baixa citotoxicidade sobre as células MDCK, 5 a 7% nas concentrações de 250, 500 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , ela também apresentou o menor valor de  $\text{IC}_{50}$ , 285,61  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , informando que das quatro espécies avaliadas *in vitro*, esta foi a que com uma menor concentração foi capaz de inibir 50% da população de amebas e ainda apresentou o maior índice de seletividade (IS), 7,00, informando que das quatro frações estudadas, foi a que apresentou maior seletividade sobre as culturas de amebas, sendo 7 vezes menos tóxica sobre as células MDCK. Mediante todas estas características acima relatadas

sobre a espécie *H. diniz-cruzae* pode-se afirmar que esta é um excelente alvo de pesquisa para descoberta de novos fármacos com poder amebicida.

A licorina foi avaliada por ser um alcaloide presente na composição fitoquímica das espécies *Hippeastrum canastrense* e *Hippeastrum diniz-cruzae*, como foi demonstrado na análise CG-EM. Este alcaloide apresentou valores de inibição que variaram de acordo com o aumento das concentrações e do tempo de exposição, sendo que o efeito observado sobre as culturas de *Acanthamoeba* foi concentração-tempo dependente. Em todas as concentrações avaliadas, o poder amebicida da licorina (8 a 61% de inibição) foi inferior ao da clorexidina (35 a 93% de inibição), comprovando que este alcaloide, de forma isolada, não apresenta um potencial amebicida peculiar ao potencial observado nas frações alcaloídicas das espécies de *H. canastrense* e *H. diniz-cruzae* e isto direciona o foco da atividade amebicida observada nas frações para outros alcaloides isoquinolínicos presentes nestas espécies ou para uma possível atividade sinérgica entre a licorina e outro alcaloide presente nas frações, situação esta que já foi descrita em um estudo por Giordani, Weizenmann e colaboradores, em 2010, quando a licorina juntamente com a candimina, foram submetidas a testes *in vitro* em culturas de *Trichomonas vaginalis* e apresentaram resultados promissores, inibindo fortemente a atividade das enzimas ectonucleotidases (GIORDANI, WEIZENMANN et al., 2010).

Com relação à avaliação da citotoxicidade sobre as culturas de células MDCK, a licorina apresentou-se citotóxica nas concentrações testadas e assim como foi observado o efeito concentração dependente sobre as culturas de *Acanthamoeba*, também foi observado este mesmo efeito sobre as células MDCK. Este resultado de citotoxicidade não é semelhante ao observado na espécie *Hippeastrum diniz-cruzae* podendo ser explicado pelo fato de não ter a concentração da licorina suficiente na fração alcaloídica para desencadear uma porcentagem de inibição significativa sobre as culturas. A citotoxicidade observada na clorexidina, 97% de inibição, quando comparada a citotoxicidade da licorina, que variou de 15 a 36%, permite afirmar que a licorina apresenta uma citotoxicidade inferior a da clorexidina sobre as células MDCK, sendo a licorina menos citotóxica que a clorexidina. Estes resultados descritos para a licorina, como um composto isolado, não possuem características que a enquadrem como um promissor alvo de pesquisa para se tornar um possível agente amebicida, pois este alcaloide de Amaryllidaceae apresentou baixa atividade

anti-*Acanthamoeba castellanii* (8 a 61% de inibição) e citotoxicidade significativa (15 a 36%) sobre as culturas avaliadas nas concentrações testadas neste trabalho.

Mediante ao que foi exposto anteriormente, é claramente necessária a realização de mais testes *in vitro* e *in vivo* dos alcaloides identificados nas frações alcaloídicas da *H. canastrense* e *H. diniz-cruzae*, pela análise CG-EM, sobre as culturas de *Acanthamoeba* para averiguar com mais clareza e profundidade os mecanismos que envolvem esta possível associação entre estes alcaloides de Amaryllidaceae e a atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* registrada neste trabalho.



## 8 CONCLUSÃO

As frações alcaloídicas das espécies *Hippeastrum canastrense* e *Hippeastrum diniz-cruzae* apresentaram alta atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* sobre as culturas de trofozoítos de *Acanthamoeba*, quando estas frações apresentaram um valor de 100% de inibição na concentração de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , valor este que foi superior ao observado na clorexidina, que foi de 86% de inibição.

As frações alcaloídicas das espécies *Hippeastrum canastrense*, *Hippeastrum diniz-cruzae*, *Crinum giganteum* e *Hippeastrum puniceum* apresentaram citotoxicidade significativa sobre as culturas celulares, 5 a 51% de inibição, sendo estes valores inferiores ao observado na clorexidina, 97% de inibição. Os valores de  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{CC}_{50}$  e índice de seletividade (IS) calculados para *H. canastrense*, *H. diniz-cruzae*, *Crinum giganteum*, *H. puniceum* foram de 285,61 a 962,75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 1998,27 a 2870,37  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 2,38 a 7,0; respectivamente.

A espécie *H. diniz-cruzae* destacou-se por apresentar, além de 100% de inibição sobre as culturas de *Acanthamoeba*, apresentou baixa citotoxicidade não significativa, 5 a 7% de inibição, sobre as células de mamíferos MDCK, menor valor de  $\text{IC}_{50}$ , 285,61  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e maior índice de seletividade, 7,00. Estes dados reunidos na espécie *H. diniz-cruzae* faz dela uma excelente fonte de pesquisa para descoberta de novos agentes terapêuticos amebicidas.

A licorina apresentou uma porcentagem de inibição sobre as culturas de *Acanthamoeba*, que variou de 8 a 61%, sendo todos os resultados inferiores aos observados na clorexidina, que variou de 35 a 93%. A citotoxicidade da licorina sobre as culturas de células MDCK foi significativa, com valores que foram de 15 a 36% de inibição, e quando comparados esses resultados ao observado na clorexidina, 97% de inibição, este alcaloide apresentou uma citotoxicidade inferior. O valor de  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{CC}_{50}$  e IS calculados para licorina foram 468,75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 596,47  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 1,27, respectivamente. Diante destes resultados, não é possível apontar este alcaloide de Amaryllidaceae como uma opção alternativa para o tratamento da CA, porque apesar de ter uma citotoxicidade inferior a da clorexidina, a licorina não apresentou uma atividade anti-*Acanthamoeba castellanii* superior a clorexidina

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCÓN, M., CEA, G., WEIGERT, G. Clastogenic effect of hippeastidine (HIPP) (1,2,3,4,4a,6, hexahydro-10,hydroxy-3,8,9,trimethoxy-5,10b, ethanophenantridine), **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, p. 508-512, 1986.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALVARENGA, L.S.; FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A. L. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n. 2, p. 155-159, 2000.
- AMARAL, L. A produção de Amarílis no mercado brasileiro de flores. **Bioikos**, v.20, n. 2, p. 71- 74, 2006.
- ANDRADE, J. P.et al. Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. **Molecules**, v.16, n. 8, p. 7097-7104, 2011.
- ANDRADE, J.P. et al. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. **Revista Latinoamericana de Química**. v 40, n. 2, p. 83-98, 2012.
- ANTOUN, M.D. et al. Cytotoxic of *Hymenocallis expansa* alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 56, p 1423-1425, 1993.
- BADRIA, F. A. et al. Lethal Effects of *Helianthemum lippii* ( L .) on *Acanthamoeba castellanii* cysts in vitro. **Parasitology Research** v. 52, n. 3, p. 243–249, , 2014.
- BAND, R.; MOHRLOK, S. The cell cycle and induced amitosis in *Acanthamoeba*. **The Journal of protozoology**, v. 20, n. 5, p. 654-657, 1973.
- BASTIDA, J. et al. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: MUÑOZ-TORRERO, D. **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**, Kerala, Transworld Research Network, p.65-100, 2011.
- BASTIDA, J.; LAVILLA, R.; VILADOMAT, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In: MUÑOZ-TORRERO, D. **The Alkaloids**. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Scientific Publishing, v.63, p. 87-179, 2006.
- BCRJ MDCK. Banco de Células do Rio de Janeiro. p. 8–10, 2014.
- BEATTIE, T. K. et al. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: A new risk factor for infection? **Ophthalmology** v. 110, n. 4, p. 765–771, 2003.
- BERKOV, S. et al. Alkaloid diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*. **Chemistry & Biodiversity**, v.8, n. 1, p.115-130, 2011.

BESSA, C. D. P. B. **Estudo químico e biológico em alcaloides de *Hippeastrum aulicum* (KER GAWL.) HERB.: uma espécie da família Amaryllidaceae.** Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, p 6 -120, 2015.

BREMER, B. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2009.

BYERS, T. J. et al. Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. **Review of Infectious Diseases**, v. 13, n.5, p. S373-S384, 1991.

CANDIDO, R. S. et al. *Hippeastrum* species in areas of restinga in the state of Rio de Janeiro, Brazil: pollen characters. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p.661-668, 2013.

CARVALHO, F. R. S. et al. Twenty years of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea**, v. 28, n. 5, p. 516-519, 2009.

CARVALHO, K. R. et al. Cytotoxic Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum* Lindl. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 1976-1980, 2015.

CASTELLANI, A. An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. **Journal Trop Med Hyg**, v. 33, p. 160, 1930.

CHASE, M.W. et al. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families *Amaryllidaceae*, *Asparagaceae* and *Xanthorrhoeaceae*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, n. 2, p. 132-136, 2009.

CHAVES-MUNGUIA, B. et al. Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology** v. 52, p. 153-158, 2005.

COSTA, A O. et al. Characterization of *acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Parana, Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 70-75, 2010.

CULBERTSON, C. G. et al. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. **Science**, v. 127, n. 3313, p. 1506-1506, 1958.

DAHLGREN, R. M. T. et al. **The Families of the Monocotyledons: Stuktur, Evolution, and Taxonomy.** Springer, p.520. Berlin, 1985.

DUARTE, J. L. et al. Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 9–14, 2013.

DUDLEY, R. et al. Cellulose biosynthesis pathway is a potential target in the improved treatment of *Acanthamoeba* keratitis. **Applied Microbial and Cell Physiology** v.75, p. 133-140, 2007

DUTILH, J. H. A. Ornamental Bulbous Plants of Brasil. **Acta Hort. (ISHS)**,v. 683, p.37-42, 2005.

DUTILH, J. H. A.; OLIVEIRA, R. S. *Amaryllidaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4355>>. Acesso em: agosto de 2016.

EL-SAYED, N. M. et al. In vitro amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea* L., *Curcuma longa* L. and *Pancratium maritimum* L. on *Acanthamoeba castellanii* cysts. **Parasitology research**, v. 110, n. 5, p. 1985–92, maio 2012.

EVIDENTE, A. et al. Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. **Planta Medica**, v.75, n. 5, p. 501-507, 2009.

FENG, T. et al. *Amaryllidaceae* alkaloids from *Lycoris radiata*. **Helv. Chim. Acta**, v. 94, n.1, p. 178-183, 2011.

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, v.24, n. 10, p. 2141-2156, 1985.

GIORDANI, R. B. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (*Amaryllidaceae*). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2042-2046, 2008.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B. et al. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. **Journal Natural Products**, v. 73, n.12, p. 2019-2023, 2010.

GIORDANI, R. B.; WEIZENMANN, M. et al. *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. **Parasitology International**, v. 59, n. 2, p. 226-231, 2010.

GOZE, I. et al. In vitro amoebicidal activity of *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa* on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 25, n. 4, p. 293-298, 2009.

HAMMERSMITH, K. M. Diagnosis and management of *Acanthamoeba keratitis*. **Current opinion in ophthalmology**, v. 17, n. 4, p. 327-331, 2006.

HEREDERO-BERMEJO, I. et al.; In vitro comparative assessment of different viability assays in *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites, **Parasitol Research**, v.112, n.12, p. 4087–4095, 2013.

HOFMANN JUNIOR, A. E. et al. Avaliação da atividade antiviral e determinação do perfil cromatográfico de *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert (Amaryllidaceae). **Rev. Bras. Farmacognosia**. v.14, n. 1, p. 7-14. 2004.

ISO/EN10993-5. International Standard ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. **Anais**.Genova: 2009

JIN, Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 28, n.6, p. 1126-1142, 2011.

KAYA, G. I. et al. Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. **Phytochem. Lett.**, v.4,n. 3, 301-305, 2011.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 4, p. 564–95, jul. 2006.

KILVINGTON, S.; ANGER C., A comparison of cyst age and assay method of the efficacy of contact lens disinfectants against *Acanthamoeba*. **British Journal of Ophthalmology** v. 85, p.336-340, 2001.

KUŹMA, Ł. et al. Abietane diterpenoids from *Salvia sclarea* transformed roots as growth inhibitors of pathogenic *Acanthamoeba* spp.**Parasitology research**, v. 114, n. 1, p. 323-327, 2015.

LABRAÑA, J. et al. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. transcarpathicus (Amaryllidaceae).**Phytochemistry**, v. 60, n. 8, p. 847-852, 2002.

LAMORAL-THEYS, D. et al. Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 6244-6256, 2010.

LIM, N. et al. Comparison of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine as Monotherapy Agents in the Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 145, n. 1, p. 130–135, 2008.

LIN, L. Z. et al. Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. **Phytochemistry**, v.40, p. 1295-1298, 1995.

LIKHITWITAYAWUID, K. et al. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. **Journal Natural Products**, v.56, p. 1331-1338, 1993.

LORENZO-MORALES, J. et al. *Acanthamoeba* keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 181–187, 2013.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite Paris**, France, v. 22, p. 10, jan. 2015.

LUKÁČ, M. et al. Synthesis, self-aggregation and biological properties of alkylphosphocholine and alkylphosphohomocholine derivatives of cetyltrimethylammonium bromide, cetylpyridinium bromide, benzalkonium bromide (C16) and benzethonium chloride, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 46-55, 2013.

LUO, Z. et al. Cytotoxic alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes candida*. **Journal Natural Products**, v.75, n. 12, p. 2113-2120, 2012.

MAELICKE, A. et al. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. **Biology Psychiatry**, v. 49, p. 279-288, 2001.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 273–307, 2003.

MATHARU, B. et al. Galanthamine inhibits  $\beta$ -amyloid aggregation and cytotoxicity. **Journal of Neurological Science**, v. 280, p. 49-58, 2009.

MCNULTY, J. et al. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type *Amaryllidaceae* alkaloids. **Phytochemistry**, v. 68, p.1068-1074, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NAIR, J.J., VAN STADEN, J. Pharmacological and toxicological insights to the South African *Amaryllidaceae*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p.262-275, 2013.

NAGINGTON, J. et al. Amoebic infection of the eye. **The Lancet**, v. 304, n. 7896, p. 1537-1540, 1974.

NIEDERKORN, J. Y. et al. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 6, p. 437–443, 1999.

NOSE, W. et al. Ulcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 51, n. 6, p. 223–226, 1988.

OBEID, W. N. et al. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba*: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 2003.

OSORIO, E. J. et al. In *vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (*Amaryllidaceae*). **Phytochemistry Letters**, v. 3, n.3, p.161-163, 2010.

OSTRAP E.M. et al. Dynamic localization of myosin-I to endocytic structures in *Acanthamoeba*. **Cell Motility and the Cytoskeleton** .v. 54, p. 29-40, 2003.

PAGE, F. C. Taxonomic and ecological distribution of potentially pathogenic free-living amoebas. **Journal Parasitol**, v. 56, n. ssuppl, 1970.

PAGE, M. A.; MATHERS, W. D. *Acanthamoeba* keratitis: A 12-Year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. **Journal of Ophthalmology**, v.3, n 1, p. 1999, 2013.

PAGLIOSA, L. B. et al. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. **Phytomedicine**, v.17, p. 698-701, 2010.

PARMAR, D. N. et al. Tandem Scanning Confocal Corneal Microscopy in the Diagnosis of Suspected *Acanthamoeba* Keratitis. **Ophthalmology**, v. 113, n. 4, p. 538–547, 2006.

PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents, 120. *Pancratium littorale*. **Journal Natural Products**, v. 49, 995-1002, 1986.

POLAT, Z.A. et al. A. *in vitro* amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells, **Parasitology Research**, v. 101, p.397–402, 2007.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphology of cystic wall and taxonomy of genus *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, v. 13, n. 4, p. 557-598, 1977.

REYES-CHILPA, R. et al. Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. **Molecules**, v. 16, p. 9520-9533, 2011.

RIBEIRO, M. C. M; JUNIOR, H. Uso tradicional terapêutico de espécies pertencentes ao gênero vegetal *Eucharis Planchon & Linden* (Amaryllidaceae). **Revista Fitos**. v. 10, n. 1, p. 13-22, maio 2016. ISSN 2446-4775.

RIVIÈRE, D. et al. Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 1, p. 78–83, 2006.

ROGERSON, A.; PATTERSON. DJ., The naked ramicristate amoebae (gymnamoebae). **The illustrated Guide to the Protozoa**. 2nd edition. (Lee JJ, Leedale GF & Bradbury P eds) Allen Press Inc., Lawrence, KS, p. 1023-1052, 2000.

SAUTER, I.P. et al. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. **Parasitology Research**, v. 109, p.1367–1371, 2011.

SENER, B.; ORHAN, I.; SATAYAVIVAD, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. **Phytother. Res**, v. 17, p.1220-1223, 2003.

SCHROEDER, J. M. et al. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 5, p. 1903-11, 2001

SCHUSTER, F. L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342–354, 2002.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 9, p. 1001–1027, 2004.

SILVA, A. F. S., *Hippeastrum vittatum* (L'Hérb) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcaloides isolados. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SILVA, A.F.S. et al. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsivant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 85, p. 148-54, 2006.

SILVA, A.F.S., et al. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. **Phytomedicine**, v. 15, p. 882-885, 2008.

SILVA, C.V., et al. Phytochemistry of some Brazilian Plants with Aphrodisiac Activity. En Rao, V. (Ed.), **Phytochemicals** - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. InTech, p. 307-326. ISBN: 978-953-51-0296-0, 2012.

STOHR, M. et al. The cell cycle and its relationship to development in *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of Cell Science**, v. 88, n. 5, p. 579-590, 1987.

STOTHARD, D. R. et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45,n.1, p. 45-54. 1998.

TEPE, B. et al. *In vitro* amoebicidal activities of *Teucrium polium* and *T. chamaedrys* on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 1773–8, maio 2012.

TORIIZUKA, Y. et al. New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 24, p. 10182-10189, 2008.

TRAM, N.T.N. et al. *Crinum* L. (Amaryllidaceae). **Fitoterapia**. v. 73, p.183-208, 2002.

TURNER, N. A et al. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 27–34, 2000.

UNVER, N. New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 125-135, 2007.

VAN GOIETSENOVEN, G. et al. Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isocarboxtyrils are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers **Medicinal Research Reviews**. v. 33, p. 439-455, 2012.



VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F. L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clin. Microbiol. Newsletter**, v. 30, p. 151-158, 2008

VISVESVARA, G. S. et al. Pathogenic and opportunistic freeliving amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappina diploidea*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 1-26. 2007.

YOUSSEF, D.T.A., FRAHM, A.W.. Alkaloids of the flowers of *Panocratium maritimum*. **Planta Medica**, v.64, p. 669-670, 1998.

## 10 APÊNDICES

### APÊNDICE A

#### PRIMEIRA ETAPA DE SELEÇÃO DE AMARYLLIDACEAE

#### DADOS COMPLEMENTARES DO GRÁFICO 1

Tabela 3 - INIBIÇÃO DAS 22 FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE AMARYLLIDACEAE E DA CLOREXIDINA SOBRE OS TROFOZOÍTOS DE *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

Concentração [ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ]	Inibição das frações de <i>Amaryllidaceae</i> (%)	Concentração [ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ]	Inibição das frações de <i>Amaryllidaceae</i> (%)
F1	28	F13	5
F2	43	F14	30
F3	12	F15	34
F4	38	F16	7
F5	40	F17	33
F6	3	F18	18
F7	44	F19	31
F8	2	F20	15
F9	18	F21	33
F10	14	F22	54
F11	9	Clrx	86
F12	8		

## APÊNDICE B

### ANÁLISE POR CG-EM DAS FRAÇÕES ALCALOÍDICAS DE AMARYLLIDACEAE

Quadro 2 - Alcaloides identificados por CG-EM nas frações alcaloídicas

GC MS - <i>Hippeastrum.diniz cruziae</i> – fração alcaloídica dos bulbos		
Alcaloides	Esqueleto	Porcentagem (%)
11,12-Dihidrolícorina	tipo lícorina	1,19%
Lícorina	tipo lícorina	46,58%
Derivado esqueleto básico homolícorina	tipo homolícorina	1,24%
Pseudolícorina	tipo lícorina	4,19%
Derivado esqueleto básico lícorina	tipo lícorina	6,80%
Ungiminorina	tipo lícorina	17,77%
Derivado esqueleto básico lícorina	tipo lícorina	22,22%
<b>Total</b>		100,00%
GC MS – <i>Hippeastrum canastrense</i> – fração alcaloídica dos bulbos		
Alcaloides	Esqueleto	Porcentagem (%)
Galantaminn	tipo galantamina	2,00%
Sanguinina	tipo galantamina	2,92%
Derivado esqueleto básico homolícorina	tipo homolícorina	1,10%
O-Metillicorenina	tipo homolícorina	1,05%
8-O-Dimetilmaritidina	tipo haemantamina	0,88%
Caranina	tipo lícorina	0,17%
7-Metoxi-O-Metillicorenina	tipo homolícorina	17,92%
Derivado esqueleto básico homolícorina	tipo homolícorina	6,51%
Tazetina	tipo tazetina	2,43%
Derivado esqueleto básico homolícorina	tipo homolícorina	0,65%
Derivado esqueleto básico homolícorina	tipo homolícorina	0,50%
Lícorina	tipo lícorina	11,13%
Derivado esqueleto básico homolícorina	tipo homolícorina	2,02%
Derivado esqueleto básico homolícorina	tipo homolícorina	11,77%
Derivado esqueleto básico homolícorina	tipo homolícorina	6,66%
Derivado esqueleto básico homolícorina (substituição 2-metoxi)	tipo homolícorina	5,06%
Derivado esqueleto básico homolícorina (substituição 2-metoxi)	tipo homolícorina	3,85%
Ungerina	tipo homolícorina	23,40%
<b>Total</b>		100,00%

Fonte: Dados fornecidos pelo colaborador Dr. Jean Paulo de Andrade do Laboratório de Produtos Naturais/UFES

## 11 ANEXOS

### Anexo I

#### ***PROTOCOLO DE APROVAÇÃO/SUBMISSÃO EM COMITÊ DE ÉTICA***

De acordo com a Resolução CNS no 466/12 que regulamenta as pesquisas que envolvem seres humanos, as cepas de amebas não se enquadram na categoria que exige a submissão. No entanto, como o material biológico foi obtido de pacientes e estes tiveram seus dados coletados, o projeto foi submetido ao CEP/CCS com o No de Parecer: CEP/CCS – 005/07, alcançando a aprovação pelo Comitê de Ética.

## Anexo II

### **EQUIPAMENTOS UTILIZADOS**

- **Agitador/ Chapa aquecedora**

Marca: Nova Ética Modelo: 114 Origem São Paulo

- **Balança de Precisão**

Marca: Bel Modelo: S-303 Origem: Itália

- **Bomba a Vácuo**

Marca Nova Modelo 1613 Origem: Piracicaba/ SP

- **Cabine de Fluxo Laminar** (Cabine de Segurança Biológica),

Modelo: BioSeg 12 Classe II Tipo A1 Marca: Grupo Veco Origem: Campinas/SP.

- **Câmara de Neubauer**

Neubauer Improved Brightline - Qualividros.

- **Centrífuga**

Modelo: 206/Baby I Centrífuger Origem: São Paulo – Brasil.

- **Estufa Incubadora Microprocessadora de Cultura Bacteriológica**

Modelo: Q 316M Marca: Quimis Origem: Diadema/SP – Brasil

- **Estufa de CO<sub>2</sub> para Cultivo Celular**

Marca: Thermo Scientific Modelo: 3111 Origem: Estados Unidos

- **Filtro para meio**

Marca Nalgene Modelo: Nalgene Maximum Pressure(1 Bar)

- **Freezer**

Marca: Eletrolux Modelo: FE18 Super Origem: Brasil

- **Garrafa de Cultivo 25cm<sup>3</sup>**

Thermo Scientific, ref 130189, frasco ventilado.

- **Leitor de Absorbância de Microplacas:**

Marca Bio Rad Modelo: i-Mark Origem: Japão.

- **Microplaca de cultivo celular**

Placa 96 poços ref: 92096 TPP- Europa

- **Microscópio Biológico Óptico Biocular**

Marca: Olympus Modelo: BX51TF Origem: Japão

- **Microscópio Invertido**

Marca: Robhe: Rolemberg e Bhering (Ken –A Vision)

- **Peagâmetro Digital**

Marca: Labmeter Model PH2 Modelo: PH5-3B Origem:( Biosystems)

- **Refrigerador**

Marca: Eletrolux Modelo DF42 Frost free Origem: Brasil

- **Sonicador Ultrassônico**

Marca Unique Modelo: Ultrasonic Cleaner USC-8080A Origem: Brasil.